

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7364331号  
(P7364331)

(45)発行日 令和5年10月18日(2023.10.18)

(24)登録日 令和5年10月10日(2023.10.10)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/56 (2006.01)	C 1 2 N	15/56	Z N A
A 2 3 K 20/147 (2016.01)	A 2 3 K	20/147	
A 2 3 K 20/189 (2016.01)	A 2 3 K	20/189	
A 2 3 K 50/40 (2016.01)	A 2 3 K	50/40	
A 2 3 L 29/269 (2016.01)	A 2 3 L	29/269	
請求項の数 16 (全115頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2018-522994(P2018-522994)	(73)特許権者	509240479
(86)(22)出願日	平成28年11月7日(2016.11.7)		ダニスコ・ユーエス・インク
(65)公表番号	特表2019-501636(P2019-501636 A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル ・ロード 9 2 5
(43)公表日	平成31年1月24日(2019.1.24)	(74)代理人	110003579
(86)国際出願番号	PCT/US2016/060844		弁理士法人山崎国際特許事務所
(87)国際公開番号	WO2017/079751	(74)代理人	100173978
(87)国際公開日	平成29年5月11日(2017.5.11)		弁理士 朴 志恩
審査請求日	令和1年11月1日(2019.11.1)	(74)代理人	100118647
審判番号	不服2022-1353(P2022-1353/J1)		弁理士 赤松 利昭
審判請求日	令和4年1月28日(2022.1.28)	(74)代理人	100123892
(31)優先権主張番号	62/251,516		弁理士 内藤 忠雄
(32)優先日	平成27年11月5日(2015.11.5)	(74)代理人	100169993
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 今井 千裕
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 パエニバチルス ( P a e n i b a c i l l u s ) 属種マンナーゼ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号14のアミノ酸配列を有する基準ポリペプチドに由来し、マンナーゼ活性を有する、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片であって、前記基準ポリペプチドと比較した改変として以下のアミノ酸置換の組み合わせまたはアミノ酸置換の組み合わせおよび位置298でのQの挿入(以下、「Z298.01Q」という。): Y129M - K244L、Y129M - K143Q - K244L、T38E - S258D、T38E - K143Q - S258D、P19E - Q184D、P19E - K143Q - Q184D、P19E - Q184L、P19E - K143Q - Q184L、N97D - G225C、N97D - K143Q - G225C、L60Q - Y61W、N97D - G225P、N97D - K143Q - G225P、N67D - P168S、N67D - K143Q - P168S、K63L - N71D、K63L - N71D - K143Q、K63R - N71D、T228V - Y235L、K143Q - T228V - Y235L、P19E - T38E - K63L - N71D - Y129M - Q184L - K244L - S258D - N261R; N67D - Y129M - P168S - Q184L - K244L - S258D - G259P; P19E - K63L - N67D - Q78D - K80T - N97D - Y129M - G225C - T228V - K244L; P19E - T38E - N67D - N97D - Y129M - P168S - Q184L - K244L - S258D - N261R; P19E - T38E - N67D - N71D - Q78D - K80T - N97D - Y129M - P168S - G225C - K244L - S258D - N261R; T38E - K63L

- N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Q 2 4 2 L  
- K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y  
1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; N 1 0 T -  
T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - L 6 6 V - A 6 8 S - N 7 4 S - V 7 5 L -  
N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C  
- Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T  
3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1  
7 P - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 D  
- K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D  
- N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L -  
K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P  
1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2  
9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P  
1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2  
8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8  
S - S 3 0 T - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q  
1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 .  
0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V  
1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L  
- K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6  
7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C  
- T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T  
3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N  
9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L -  
K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - T 3 8 E - K 6 3  
L - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5  
C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q  
; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9  
M - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2  
4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E -  
S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1  
8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0  
1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9  
7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y  
2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0  
T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7  
D - I 1 2 4 V - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2  
3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 S - P 1 9 E  
- S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 H - K 8 0 T  
- I 8 2 M - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C  
- Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P  
1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y  
1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L  
- K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; G 4 S - N 1 0 T - P 1 9  
E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G  
2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 .  
0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K  
7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - T 1 3 1 A - F 1 6 7  
Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2  
9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3

10

20

30

40

50

L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - P  
 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D  
 - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q  
 - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 1 4 I -  
 G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N  
 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N  
 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V -  
 Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 V - P 1 9  
 E - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2  
 9 M - K 1 4 3 R - F 1 6 7 Y - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K  
 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 A - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; Y 6 E - N 1 0 T  
 - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D  
 - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - S 1 3 5 L - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2  
 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - D 2 8 3 S - Z 2 9 8 . 0 1  
 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7  
 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4  
 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2  
 9 8 . 0 1 Q ; A 2 S - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D  
 - N 7 1 D - N 7 4 E - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - N 1 5 0 T - P 1 6 8 S - Q  
 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q  
 - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 L - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K  
 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - A 1 3 6 L - P 1 6 8  
 A - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2  
 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9  
 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y  
 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9  
 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1  
 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R -  
 Z 2 9 8 . 0 1 Q ; T 3 R - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6  
 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 L - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - D 1 3 9 M  
 - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6  
 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9  
 D - N 6 7 D - A 6 8 S - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P  
 1 6 8 S - Q 1 8 4 D - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R  
 - T 2 8 4 E - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6  
 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - G 2 5 9 R ; P 1 9 E - N 6 7 D - N 7 1  
 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L  
 ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - T 2 2 8 V -  
 K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S  
 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1  
 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1  
 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; K 6  
 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2  
 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; 又は P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N  
 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R を  
 含み、

前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられ、

前記マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも95%であり、

10

20

30

40

50

前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、前記基準ポリペプチドと比較して、1つ又は複数の特性が向上しており；特性の前記向上は、プロテアーゼの存在下での安定性の向上、洗剤又はバッファ中での安定性の向上、及び洗浄性能の向上から選択され、

特性の前記向上は、

( i ) 洗剤中またはバッファ中での安定性の向上であって、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約40 ~ 約70、約45 ~ 約65、約50 ~ 約60、約60 ~ 約70、又は約56の温度にて、少なくとも5分間、少なくとも10%、20%、30%、40%、又は50%の残留マンナナーゼ活性を保持する、向上；

10

( i i ) プロテアーゼの存在下での安定性の向上であって、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、プロテアーゼ及び/又は界面活性剤の存在下で、少なくとも15日間、又は約15 ~ 約40日間、マンナナーゼ活性を少なくとも50%保持する、向上；

( i i i ) 洗浄性能の向上であって、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ローカストビーンガムの染みの洗浄PIが>1である、向上；並びに

( i v ) 所定時間経過後の洗浄性能の向上であって、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、7時間後に洗浄活性が少なくとも15%残留しており、又は9時間後に洗浄活性が少なくとも11%残留している、向上

20

である、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片。

#### 【請求項2】

前記改変は、P19E - S30T - T38E - S59V - L60Q - K63R - N67D - N97D - V103I - Y129M - F167Y - Q184L - G225C - T228V - Y235L - K244L - S258D - N261R - Z298 . 01Qであり；

前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている、請求項1に記載のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片。

#### 【請求項3】

前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに：

30

( i ) 位置31 ~ 40にてWX<sub>a</sub>KNDLXXAI (配列番号15)のモチーフ(式中、X<sub>a</sub>は、F又はYであり、Xは、任意のアミノ酸である)；

( i i ) 位置263 ~ 274にてLDXXXGPGXL T (配列番号16)のモチーフ(式中、Xは、任意のアミノ酸である)；

( i i i ) 位置263 ~ 274にてLDX<sub>1</sub>V / AT / AGPX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>LT (配列番号17)のモチーフ(式中、X<sub>1</sub>は、M又はLであり、X<sub>2</sub>は、N、A、又はSであり、X<sub>3</sub>は、S、T、又はNである)；及び

( i v ) 位置263 ~ 274にてLDM / LATGPN / AGS / TLT (配列番号18)のモチーフ

から選択される1つ又は複数のモチーフを含み、

40

前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている、請求項1または2に記載のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片。

#### 【請求項4】

前記基準ポリペプチドは、GH5マンナナーゼであり、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、GH5マンナナーゼ又はエンド - - マンナナーゼである、請求項1 ~ 3のいずれか一項に記載のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片。

#### 【請求項5】

前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、炭

50

水化物 - 結合モジュールを含まない、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含む洗浄組成物。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの界面活性剤；カルシウム及び亜鉛から選択される少なくとも 1 つのイオン；少なくとも 1 つの補助剤成分；少なくとも 1 つの安定化剤；約 0.001 重量% ~ 約 1.0 重量% の、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片；少なくとも 1 つの漂白剤；並びに / あるいはアシルトランスフェラーゼ、アミラーゼ、アルファ - アミラーゼ、ベータ - アミラーゼ、アルファ - ガラクトシダーゼ、アラビナーゼ、アラビノシダーゼ、アリアルエステラーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、ベータ - グルカナーゼ、カラギナーゼ、カタラーゼ、セロビオヒドラーゼ、セルラーゼ、コンドロイチナーゼ、クチナーゼ、エンド - ベータ - 1, 4 - グルカナーゼ、エンド - ベータ - マンナーゼ、エキソ - ベータ - マンナーゼ、エステラーゼ、エキソ - マンナーゼ、ガラクタナーゼ、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、ケラチナーゼ、ラッカーゼ、ラクターゼ、リグニナーゼ、リパーゼ、脂肪分解酵素、リポキシゲナーゼ、マンナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチナーゼ、ペントサナーゼ、ペルヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、リダクターゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ベータ - グルカナーゼ、タンナーゼ、トランスグルタミナーゼ、キシランアセチルエステラーゼ、キシラナーゼ、キシログルカナーゼ、キシロシダーゼ、メタロプロテアーゼ、及びそれら組合せから選択される少なくとも 1 つの酵素又は酵素誘導体：をさらに含む、請求項 6 に記載の洗浄組成物。

【請求項 8】

前記洗浄組成物は、( i ) 洗濯洗剤、布地柔軟仕上げ洗剤、食器洗い洗剤、及び硬質表面洗浄洗剤から選択される洗剤組成物、及び / 又は、( i i ) 液体、粉末、顆粒状の固体、タブレット、シート、及び単位用量から選択される形態の組成物、及び / 又は、( i i i ) ホスフェートを含有し、若しくはホスフェートを含有せず、且つ / 又はホウ素を含有し、若しくはホウ素を含有しない、組成物である、請求項 6 又は 7 に記載の洗浄組成物。

【請求項 9】

マンナンを含む汚れ又は染みを含む表面又はアイテムを、( i ) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片、あるいは ( i i ) 請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の洗浄組成物と接触させることを含み、前記汚れ又は前記染みに含有される前記マンナンは加水分解される、洗浄方法

【請求項 10】

前記アイテムは、皿類又は布地である、請求項 9 に記載の洗浄方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 13】

請求項 1 2 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を生産する方法であって：

( a ) 請求項 1 2 に記載の発現ベクターで請求項 1 3 に記載の宿主細胞を安定して形質転換することと、

10

20

30

40

50

(b) 形質転換された前記宿主細胞を、前記宿主細胞が前記マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を産生するのに適した条件下で培養することと；

(c) 前記マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を回収することと、  
を含む方法。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含む、食品組成物若しくは飼料組成物及び/又は食品添加物。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の、食品組成物若しくは飼料組成物、並びに/又は食品添加物若しくは飼料添加物、並びに/又は食品若しくは飼料及び/若しくはペットフードの調製における使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年11月5日出願の米国仮特許出願第62/251516号明細書、及び2016年1月13日出願の米国仮特許出願第62/278387号明細書の優先権の利益に関し、且つこれを主張する。これらの出願は双方とも、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

本明細書中で開示されるのは、*Paenibacillus* 属種由来のマンナーゼ、当該マンナーゼをコードするポリヌクレオチド、当該マンナーゼを含有する組成物、及びそれらの使用方法である。マンナーゼを含有する組成物は、洗剤としての使用に、布地及び硬い表面の洗浄に、そして種々の他の産業用途において、適している。

【0003】

電子的に提出される配列表への参照

ASCIIテキストファイル(名前:NB40843WOPCT\_\_ST25;サイズ:321KB;作成日:2016年11月3日)として本出願と共に電子的に提出された配列表の内容は、本出願の一部を形成し、そしてその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

30

【背景技術】

【0004】

エンド- $\alpha$ -マンナーゼが挙げられるマンナーゼ酵素は、マンナンを加水分解することによってガムの染みを除去する洗剤洗浄組成物に使用されてきた。種々のマンナンが自然界に見出され、例えば、直鎖マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、及びグルコガラクトマンナンがある。そのような各マンナンは、グルコース残基で最大33%置換されていてよいマンノース残基の $\alpha$ -1,4-結合骨格を含有する多糖で構成される(Yeoman et al., Adv Appl Microbiol, 70:1, 2010, Elsevier)。ガラクトマンナン又はグルコガラクトマンナンにおいて、ガラクトース残基が、アルファ-1,6-結合でマンナン骨格に結合している(Moreira and Filho, Appl Microbiol Biotechnol, 79:165, 2008)。したがって、マンナンの、その構成糖への加水分解には、エンド- $\alpha$ -1,4-マンナーゼが必要とされ、これは、骨格結合を加水分解して、短鎖のマンノオリゴサッカライドを生じさせる。マンノオリゴサッカライドはさらに、 $\alpha$ -1,4-マンノシダーゼによって単糖に分解される。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

## 【 0 0 0 5 】

マンナーゼ、例えばエンド - - マンナーゼが、工業用酵素の技術において知られているが、特定の条件及び用途に適した更なるマンナーゼが必要とされている。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 6 】

本明細書中で開示される変異体、組成物、及び方法は、従来の分子生物学技術（例えば、Sambrook et al, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press 参照）により生じる組換えマンナーゼ、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関する。別の実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) 1、2、3、4、6、10、19、28、30、38、59、60、61、62、63、66、67、68、70、71、74、75、78、80、82、93、97、103、111、124、129、131、135、136、139、143、150、167、168、184、213、214、217、225、228、235、242、244、258、259、261、283、及び284から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii) 位置298での挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、19、38、59、67、68、71、74、97、129、167、168、184、225、228、235、242、244、258、及び261から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

## 【 0 0 0 7 】

更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) M1X、A2X、T3X、G4X、Y6X、N10X、P19X、G28X、S30X、T38X、S59X、L60X、Y61X、T62X、K63X、L66X、N67X、A68X、K70X、N71X、N74X、V75X、Q78X、K80X、I82X、K93X、N97X、V103X、E111X、I124X、Y129X、T131X、S135X、A136X、D139X、K143X、N150X、F167X、P168X、Q184X、N213X、K214X、A217X、G225X、T228X、Y235X、Q242X、K244X、S258X、G259X、N261X、D283X、及びT284Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii) 位置Z298 . 01Xでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、P19X、T38X、S59X、N67X、A68X、N71X、N74X、N97X、Y129X、F167X、P168X、Q184X、G225X、T228X、Y235X、Q242X、K244X、S258X、及びN261Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

## 【 0 0 0 8 】

更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) X1V、X1L、X2S、X3R、X4S、X6E、X10T、X10S、X19E、X28A、X28S、X30T、X38E、X59D、X59V、X60Q、X61W、X62E、

10

20

30

40

50

X 6 3 R、X 6 3 L、X 6 6 V、X 6 7 D、X 6 8 S、X 7 0 R、X 7 1 D、X 7 4 E、X 7 4 S、X 7 5 L、X 7 8 D、X 7 8 H、X 8 0 T、X 8 2 M、X 9 3 R、X 9 7 D、X 9 7 L、X 1 0 3 I、X 1 1 1 D、X 1 1 1 S、X 1 2 4 V、X 1 2 9 M、X 1 3 1 A、X 1 3 5 L、X 1 3 6 L、X 1 3 9 M、X 1 4 3 Q、X 1 4 3 R、X 1 5 0 T、X 1 6 7 Y、X 1 6 8 A、X 1 6 8 S、X 1 8 4 D、X 1 8 4 L、X 2 1 3 A、X 2 1 4 I、X 2 1 7 P、X 2 2 5 C、X 2 2 5 P、X 2 2 8 V、X 2 3 5 L、X 2 4 2 L、X 2 4 4 L、X 2 5 8 D、X 2 5 9 P、X 2 6 1 Q、X 2 6 1 R、X 2 8 3 S、X 2 8 4 A、及び X 2 8 4 E から選択される 1 つ又は複数の位置での 1 つ又は複数の置換、並びに ( i i ) 位置 Z 2 9 8 . 0 1 Q での挿入；X は、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、X 1 9 E、X 3 8 E、X 5 9 V、X 6 7 D、X 6 8 S、X 7 1 D、X 7 4 E、X 7 4 S、X 9 7 D、X 9 7 L、X 1 2 9 M、X 1 6 7 Y、X 1 6 8 A、X 1 6 8 S、X 1 8 4 D、X 1 8 4 L、X 2 2 5 C、X 2 2 5 P、X 2 2 8 V、X 2 3 5 L、X 2 4 2 L、X 2 4 4 L、X 2 5 8 D、X 2 6 1 Q、及び X 2 6 1 R から選択される 1 つ又は複数の位置での 1 つ又は複数の置換から選択される 2 つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；X は、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

10

## 【 0 0 0 9 】

20

別の更なる実施形態は、以下から選択される 2 つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：( i ) M 1 V、M 1 L、A 2 S、T 3 R、G 4 S、Y 6 E、N 1 0 T、N 1 0 S、P 1 9 E、G 2 8 A、G 2 8 S、S 3 0 T、T 3 8 E、S 5 9 D、S 5 9 V、L 6 0 Q、Y 6 1 W、T 6 2 E、K 6 3 R、K 6 3 L、L 6 6 V、N 6 7 D、A 6 8 S、K 7 0 R、N 7 1 D、N 7 4 E、N 7 4 S、V 7 5 L、Q 7 8 D、Q 7 8 H、K 8 0 T、I 8 2 M、K 9 3 R、N 9 7 D、N 9 7 L、V 1 0 3 I、E 1 1 1 D、E 1 1 1 S、I 1 2 4 V、Y 1 2 9 M、T 1 3 1 A、T 1 3 5 L、A 1 3 6 L、D 1 3 9 M、K 1 4 3 Q、K 1 4 3 R、N 1 5 0 T、F 1 6 7 Y、P 1 6 8 A、P 1 6 8 S、Q 1 8 4 D、Q 1 8 4 L、N 2 1 3 A、K 2 1 4 I、A 2 1 7 P、G 2 2 5 C、G 2 2 5 P、T 2 2 8 V、Y 2 3 5 L、Q 2 4 2 L、K 2 4 4 L、S 2 5 8 D、G 2 5 9 P、N 2 6 1 Q、N 2 6 1 R、D 2 8 3 S、T 2 8 4 A、及び T 2 8 4 E から選択される 1 つ又は複数の位置での 1 つ又は複数の置換、並びに ( i i ) 位置 Z 2 9 8 . 0 1 Q での挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。別の実施形態は、P 1 9 E、T 3 8 E、S 5 9 D、S 5 9 V、N 6 7 D、A 6 8 S、N 7 1 D、N 7 4 E、N 7 4 S、N 9 7 D、N 9 7 L、Y 1 2 9 M、F 1 6 7 Y、P 1 6 8 A、P 1 6 8 S、Q 1 8 4 D、Q 1 8 4 L、G 2 2 5 C、G 2 2 5 P、T 2 2 8 V、Y 2 3 5 L、Q 2 4 2 L、K 2 4 4 L、S 2 5 8 D、N 2 6 1 Q、及び N 2 6 1 R から選択される 1 つ又は複数の位置での 1 つ又は複数の置換から選択される 2 つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

30

40

## 【 0 0 1 0 】

別の実施形態は、以下から選択される 2 つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：( i ) 1 2 9 - 2 4 4、1 2 9 - 1 4 3 - 2 4 4、3 8 - 2 5 8、3 8 - 1 4 3 - 2 5 8、1 9 - 1 8 4、1 9 - 1 4 3 - 1 8 4、9 7 - 2 2 5、9 7 - 1 4 3 - 2 2 5、6 0 - 6 1、6 7 - 1 6 8、6 7 - 1 4 3 - 1 6 8、6 3 - 7 1、6 3 - 7 1 - 1 4 3、2 2 8 - 2 3 5、及び 1 4 3 - 2 2 8 - 2 3 5 から選択される 1 つ又は複数の位置での 1 つ又は複数の置換；( i i ) Y 1 2 9 X - K 2 4 4 X、Y 1 2 9 X - K 1 4 3 X - K 2 4 4 X、T 3 8 X - S 2 5

50



8 X、T 3 8 X - K 1 4 3 X - S 2 5 8 X、P 1 9 X - Q 1 8 4 X、P 1 9 X - K 1 4 3 X - Q 1 8 4 X、N 9 7 X - G 2 2 5 X、N 9 7 X - K 1 4 3 X - G 2 2 5 X、L 6 0 X - Y 6 1 X、N 6 7 X - P 1 6 8 X、N 6 7 X - K 1 4 3 X - P 1 6 8 X、K 6 3 X - N 7 1 X、K 6 3 X - N 7 1 X - K 1 4 3 X、T 2 2 8 X - Y 2 3 5 X、及び K 1 4 3 X - T 2 2 8 X - Y 2 3 5 X から選択される 1 つ又は複数の位置での 1 つ又は複数の置換（式中、X は、あらゆるアミノ酸である）；( i i i ) X 1 2 9 M - X 2 4 4 L、X 1 2 9 M - X 1 4 3 Q - X 2 4 4 L、X 3 8 E - X 2 5 8 D、X 3 8 E - X 1 4 3 Q - X 2 5 8 D、X 1 9 E - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 8 4 L、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 L、X 9 7 D - X 2 2 5 C、X 9 7 D - X 1 4 3 Q - X 2 2 5 C、X 9 7 D - X 2 2 5 P、X 9 7 D - X 1 4 3 Q - X 2 2 5 P、X 6 0 Q - X 6 1 W、X 6 7 D - X 1 6 8 S、X 6 7 D - X 1 4 3 Q - X 1 6 8 S、X 6 3 L - X 7 1 D、X 6 3 L - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、X 6 3 R - X 7 1 D、X 6 3 R - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、X 2 2 8 V - X 2 3 5 L、及び X 1 4 3 Q - X 2 2 8 V - X 2 3 5 L から選択される 1 つ又は複数の位置での 1 つ又は複数の置換（式中、X は、あらゆるアミノ酸である）；並びに ( i v ) Y 1 2 9 M - K 2 4 4 L、Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - K 2 4 4 L、T 3 8 E - S 2 5 8 D、T 3 8 E - K 1 4 3 Q - S 2 5 8 D、P 1 9 E - Q 1 8 4 D、P 1 9 E - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 D、P 1 9 E - Q 1 8 4 L、P 1 9 E - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 L、N 9 7 D - G 2 2 5 C、N 9 7 D - K 1 4 3 Q - G 2 2 5 C、L 6 0 Q - Y 6 1 W、N 9 7 D - G 2 2 5 P、N 9 7 D - K 1 4 3 Q - G 2 2 5 P、N 6 7 D - P 1 6 8 S、N 6 7 D - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S、K 6 3 L - N 7 1 D、K 6 3 L - N 7 1 D - K 1 4 3 Q、K 6 3 R - N 7 1 D、K 6 3 R - N 7 1 D - K 1 4 3 Q、T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L、及び K 1 4 3 Q - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

【 0 0 1 1 】

更なる実施形態は、P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P；P 1 9 E - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Q 2 4 2 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P；N 1 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - L 6 6 V - A 6 8 S - N 7 4 S - V 7 5 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L；P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R -

10

20

30

40

50

N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L -  
G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P  
1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M -  
P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8  
. 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D -  
Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T  
2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1  
0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y  
- Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6  
1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0  
T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2  
8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T  
- P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2  
9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N  
2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K  
6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2  
2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0  
1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - Q 7  
8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - I 1 2 4 V - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8  
4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1  
Q ; N 1 0 S - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 6 7  
D - Q 7 8 H - K 8 0 T - I 8 2 M - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y -  
Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8  
. 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R -  
N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C -  
T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; G  
4 S - N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1  
2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D -  
N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V -  
L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M  
- T 1 3 1 A - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5  
8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5  
9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1  
1 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L -  
K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8  
E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q  
1 8 4 L - K 2 1 4 I - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R  
- Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q -  
K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G  
2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 .  
0 1 Q ; M 1 V - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7  
8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - F 1 6 7 Y - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2  
2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 A - Z 2 9 8 . 0  
1 Q ; Y 6 E - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7  
D - N 7 1 D - N 9 7 D - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - S 1 3 5 L - P 1 6 8 S - Q 1 8 4  
L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - D 2  
8 3 S - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6  
0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q  
- P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5  
8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; A 2 S - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8

10

20

30

40

50

E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 7 4 E - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - N 1  
 5 0 T - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L -  
 S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 L - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A -  
 S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M  
 - A 1 3 6 L - P 1 6 8 A - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4  
 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - K  
 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2  
 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0  
 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9  
 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S  
 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; T 3 R - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S  
 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 L - E 1 1 1 S -  
 Y 1 2 9 M - D 1 3 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4  
 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3  
 0 T - T 3 8 E - S 5 9 D - N 6 7 D - A 6 8 S - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1  
 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 D - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L -  
 S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 E - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1  
 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - N 6 7  
 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L -  
 K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - T  
 2 2 8 V - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - K 2  
 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6  
 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3  
 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5  
 9 P ; K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2  
 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; 又は P 1 9 E - T 3 8 E - K  
 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N  
 2 6 1 R を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若  
 しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ  
 酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

10

20

30

【 0 0 1 2 】

別の実施形態は、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はそ  
 の組換えポリペプチド若しくは活性断片を含むマンナナーゼの N D L - C l a d e に関し  
 、前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は：位置 3 1 ~ 4 0 にて W  
 X<sub>a</sub> K N D L X X A I ( 配列番号 1 5 ) のモチーフ ( 式中、X<sub>a</sub> は、F 又は Y であり、X  
 は、あらゆるアミノ酸である ) ( 「モチーフ 1 」 ) ; 位置 2 6 3 ~ 2 7 4 にて L D X X X  
 G P X G X L T ( 配列番号 1 6 ) のモチーフ ( 式中、X は、あらゆるアミノ酸である ) ( 「  
 欠失モチーフ 1 」 ) ; 位置 2 6 3 ~ 2 7 4 にて L D X<sub>1</sub> V / A T / A G P X<sub>2</sub> G X<sub>3</sub> L T  
 ( 配列番号 1 7 ) のモチーフ ( 式中、X<sub>1</sub> は、M 又は L であり、X<sub>2</sub> は、N、A、又は S  
 であり、X<sub>3</sub> は、S、T、又は N である ) ( 「欠失モチーフ 2 」 ) ; 及び位置 2 6 3 ~ 2  
 7 4 にて L D M / L A T G P N / A G S / T L T ( 配列番号 1 8 ) のモチーフ ( 「欠失モ  
 チーフ 3 」 ) から選択される 1 つ又は複数のモチーフを含み、変異体、又はその組換えポ  
 リペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応に  
 よって番号を付けられている。マンナナーゼの N D L - C l a d e は、2 0 1 5 年 7 月 1  
 0 日出願の国際特許出願 P C T / U S 1 5 / 4 0 0 5 7 号明細書 ( 後に国際公開第 2 0 1  
 6 / 0 0 7 9 2 9 号パンフレットとして公開 ) においてより完全に記載されている。

40

【 0 0 1 3 】

他の実施形態において、マンナナーゼ変異体は、エンド - - マンナナーゼである。一  
 部の実施形態において、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性  
 断片は、配列番号 1 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 % のアミノ酸配列同一性を

50

有する。一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、マンナーゼ活性、例えばローカストビーンガムガラクトマンナン又はコンニャクグルコマンナンに対する活性を有する。一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、界面活性剤の存在下でマンナーゼ活性を有する。一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約40～約70、約45～約65、約50～約60、約60～約70、又は約56の温度にて、少なくとも5分間、少なくとも10%、20%、30%、40%、又は50%の残留マンナーゼ活性を保持する【0014】

一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、洗剤組成物中で洗浄活性を有する。一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、プロテアーゼの存在下でマンナーゼ活性を有する。一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、プロテアーゼ及び/又は界面活性剤の存在下で、約15日間以上、又は約15～約40日間、マンナーゼ活性を少なくとも50%保持する。一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、グアーガム、ローカストビーンガム、及びそれらの組合せからなる群から選択される基質を加水分解することができる。一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、炭水化物-結合モジュールを含まない。

#### 【0015】

別の実施形態は、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含む洗浄組成物に関する。一部の実施形態において、洗浄組成物はさらに、界面活性剤を含む。一部の実施形態において、界面活性剤は、イオン性界面活性剤である。一部の実施形態において、イオン性界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、双性イオン性界面活性剤、及びそれらの組合せからなる群から選択される。一部の実施形態において、当該組成物はさらに、アシルトランスフェラーゼ、アミラーゼ、アルファ-アミラーゼ、ベータ-アミラーゼ、アルファ-ガラクトシダーゼ、アラビナーゼ、アラビノシダーゼ、アリアルエステラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルカナーゼ、カラギナーゼ、カタラーゼ、セロビオヒドラーゼ、セルラーゼ、コンドロイチナーゼ、クチナーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、エンド-ベータ-マンナーゼ、エキソ-ベータ-マンナーゼ、エステラーゼ、エキソ-マンナーゼ、ガラクタナーゼ、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、ケラチナーゼ、ラッカーゼ、ラクターゼ、リグニナーゼ、リパーゼ、脂肪分解酵素、リポキシゲナーゼ、マンナーゼ、メタロプロテアーゼ、オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチナーゼ、ペントサナーゼ、ペルヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、リダクターゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、タンナーゼ、トランスグルタミナーゼ、キシランアセチルエステラーゼ、キシラナーゼ、キシログルカナーゼ、キシロシダーゼ、及びそれら組合せからなる群から選択される酵素を含む。一部の実施形態において、当該組成物はさらに、プロテアーゼ及びアミラーゼを含む。一部の実施形態において、洗浄組成物は、洗濯洗剤、布地柔軟仕上げ洗剤、食器洗い洗剤、及び硬質表面洗浄洗剤から選択される。一部の実施形態において、当該組成物は、顆粒、粉末、固体、バー、液体、タブレット、ゲル、ペースト、泡、シート、又は単位用量の組成物である。一部の実施形態において、洗浄組成物は、液体、粉末、顆粒状の固体、及びタブレットから選択される形態である。

#### 【0016】

更なる実施形態は、洗浄方法であって、マンナンを含む汚れ又は染みを含む表面又はアイテムを、(i)本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプ

チド若しくは活性断片、あるいは ( i i ) 本明細書中に記載される洗浄組成物と接触させることを含み、前記汚れ又は前記染みに含有されるマンナンは加水分解される、洗浄方法に関する。

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態はさらに、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードする核酸又は単離された核酸に関する。更なる実施形態は、調節配列に作動可能に結合された、本明細書中に記載される核酸又は単離された核酸を含む発現ベクターに関する。更なる実施形態は、本明細書中に記載される発現ベクター、あるいは本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードする核酸を含む宿主細胞に関する。一部の実施形態において、宿主細胞は、細菌細胞又は真菌細胞である。更なる実施形態は、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を生産する方法であって：マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで宿主細胞を安定して形質転換することと；形質転換された宿主細胞を、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を生産するのに適した条件下で培養することと；マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を回収することを含む方法に関する。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 図 1 は、液体洗濯洗剤中での 1 6 での、ローカストビーンガム ( C F T C - S - 7 3 ) に及ぼす P s p M a n 1 3 8 マンナーゼ及び市販のマンナーゼ ( M A N N A W A Y 4 L ( 登録商標 ) , N o v o z y m e s A S , D e n m a r k ) の洗浄性能を示す。

20

【 図 2 A 】 図 2 A は、 P s p M a n 1 3 8 マンナーゼ及び P s p M a n 4 マンナーゼを含む N D L - クレードマンナーゼの成熟した形態の、 B c i M a n 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ B A D 9 9 5 2 7 . 1 ( 1 W K Y \_\_ A )、B . ネアルソニイ ( B \_\_ n e a l s o n i i ) \_\_ A G U 7 1 4 6 6 . 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ W O 2 0 1 5 0 2 2 4 2 8 - 0 0 1 5、及び B . レンタス ( B . l e n t u s ) \_\_ W O 2 0 1 4 1 0 0 0 1 8 - 0 0 0 2 を含む他のマンナーゼの種々の成熟した形態の配列との M U S C L E アライメントを示しており、当該アライメントは、位置 3 1 ~ 4 0 及び 2 6 3 ~ 2 7 4 にて、N D L - クレードモチーフの周りにボックスを含む。

30

【 図 2 B 】 図 2 B は、 P s p M a n 1 3 8 マンナーゼ及び P s p M a n 4 マンナーゼを含む N D L - クレードマンナーゼの成熟した形態の、 B c i M a n 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ B A D 9 9 5 2 7 . 1 ( 1 W K Y \_\_ A )、B . ネアルソニイ ( B \_\_ n e a l s o n i i ) \_\_ A G U 7 1 4 6 6 . 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ W O 2 0 1 5 0 2 2 4 2 8 - 0 0 1 5、及び B . レンタス ( B . l e n t u s ) \_\_ W O 2 0 1 4 1 0 0 0 1 8 - 0 0 0 2 を含む他のマンナーゼの種々の成熟した形態の配列との M U S C L E アライメントを示しており、当該アライメントは、位置 3 1 ~ 4 0 及び 2 6 3 ~ 2 7 4 にて、N D L - クレードモチーフの周りにボックスを含む。

【 図 2 C 】 図 2 C は、 P s p M a n 1 3 8 マンナーゼ及び P s p M a n 4 マンナーゼを含む N D L - クレードマンナーゼの成熟した形態の、 B c i M a n 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ B A D 9 9 5 2 7 . 1 ( 1 W K Y \_\_ A )、B . ネアルソニイ ( B \_\_ n e a l s o n i i ) \_\_ A G U 7 1 4 6 6 . 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ W O 2 0 1 5 0 2 2 4 2 8 - 0 0 1 5、及び B . レンタス ( B . l e n t u s ) \_\_ W O 2 0 1 4 1 0 0 0 1 8 - 0 0 0 2 を含む他のマンナーゼの種々の成熟した形態の配列との M U S C L E アライメントを示しており、当該アライメントは、位置 3 1 ~ 4 0 及び 2 6 3 ~ 2 7 4 にて、N D L - クレードモチーフの周りにボックスを含む。

40

【 図 2 D 】 図 2 D は、 P s p M a n 1 3 8 マンナーゼ及び P s p M a n 4 マンナーゼを含む N D L - クレードマンナーゼの成熟した形態の、 B c i M a n 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ B A D 9 9 5 2 7 . 1 ( 1 W K Y \_\_ A )、B . ネアルソニイ ( B \_\_ n e a

50

l s o n i i ) \_ A G U 7 1 4 6 6 . 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ W O 2 0 1 5 0 2 2 4 2 8 - 0 0 1 5、及び B . レンタス ( B . l e n t u s ) \_ W O 2 0 1 4 1 0 0 0 1 8 - 0 0 0 2 を含む他のマンナーゼの種々の成熟した形態の配列との M U S C L E アラインメントを示しており、当該アラインメントは、位置 3 1 ~ 4 0 及び 2 6 3 ~ 2 7 4 にて、N D L - クレドモチーフの周りにボックスを含む。

【図 2 E】図 2 E は、P s p M a n 1 3 8 マンナーゼ及び P s p M a n 4 マンナーゼを含む N D L - クレドマンナーゼの成熟した形態の、B c i M a n 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ B A D 9 9 5 2 7 . 1 ( 1 W K Y \_ A )、B . ネアルソニイ ( B \_ n e a l s o n i i ) \_ A G U 7 1 4 6 6 . 1、バチルス ( B a c . ) 属種 \_\_ W O 2 0 1 5 0 2 2 4 2 8 - 0 0 1 5、及び B . レンタス ( B . l e n t u s ) \_ W O 2 0 1 4 1 0 0 0 1 8 - 0 0 0 2 を含む他のマンナーゼの種々の成熟した形態の配列との M U S C L E アラインメントを示しており、当該アラインメントは、位置 3 1 ~ 4 0 及び 2 6 3 ~ 2 7 4 にて、N D L - クレドモチーフの周りにボックスを含む。

10

【図 3】図 3 は、G e n e i o u s T r e e ビルダープログラムを用いて構築した種々のマンナーゼの成熟した形態のアミノ酸についての系統樹を示しており、P s p M a n 1 3 8 マンナーゼ及び P s p M a n 4 マンナーゼを含む種々の N D L - クレドマンナーゼを含む。

【図 4】図 4 は、粉末洗濯洗剤中での 1 6 での、ローカストビーンガム ( C F T C - S - 7 3 ) に及ぼす P s p M a n 1 1 8 マンナーゼ及び市販のマンナーゼ ( M A N N A W A Y ( 登録商標 ) 4 L , N o v o z y m e s A S , D e n m a r k ) の洗浄性能を示す

20

【図 5】図 5 は、1 W K Y \_ A マンナーゼの、P s p M a n 1 1 8 マンナーゼ変異体との構造比較を示しており、1 W K Y \_ A マンナーゼの主鎖を灰色で示し、P s p M a n 1 1 8 マンナーゼの主鎖を黒色で示す。

【図 6】図 6 は、P s p M a n 1 1 8 の N D L モチーフ及び欠失モチーフの領域における、P s p M a n 1 1 8 構造及び 1 W K Y \_ A 構造の構造比較を示す。

【図 7 A】図 7 A は、P s p M a n 1 4 8 ( 黒色 ) マンナーゼ及び 2 W H L \_ A ( 薄い灰色 ) マンナーゼの主鎖折畳みの比較を示しており、2 W H L \_ A に結合するマンノトリオシル部分は、( 基質結合部位の相対的位置を示すために ) 灰色のスティックとして示し、P s p M a n 1 4 8 に存在する 1 8 個のアミノ酸置換の側鎖を、黒色のスティック図として示す。

30

【図 7 B】図 7 B は、P s p M a n 1 4 8 ( 黒色 ) マンナーゼ及び 2 W H L \_ A ( 薄い灰色 ) マンナーゼの主鎖折畳みの比較を示しており、2 W H L \_ A に結合するマンノトリオシル部分は、( 基質結合部位の相対的位置を示すために ) 灰色のスティックとして示し、基質結合部位の周りの、且つ近くの、P s p M a n 1 4 8 における 7 個の置換 ( S 3 0 T、S 5 9 V、L 6 0 Q、K 6 3 R、T 2 2 8 V、S 2 5 8 D、及び N 2 6 1 R ) の位置を、黒色の球として示す。

【図 7 C】図 7 C は、P s p M a n 1 4 8 ( 黒色 ) マンナーゼ及び 2 W H L \_ A ( 薄い灰色 ) マンナーゼの主鎖折畳みの比較を示しており、2 W H L \_ A に結合するマンノトリオシル部分は、( 基質結合部位の相対的位置を示すために ) 灰色のスティックとして示し、P s p M a n 1 4 8 における 1 1 個の表面置換を、黒色の球として示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書中で記載されるのは、パエニバチルス ( P a e n i b a c i l l u s ) 属種由来のエンド - - マンナーゼ、そのようなエンド - - マンナーゼをコードするポリヌクレオチド、そのようなマンナーゼを含有する洗浄組成物、及びそれらの使用方法である。一実施形態において、本明細書中で記載されるパエニバチルス ( P a e n i b a c i l l u s ) 属種エンド - - マンナーゼは、グリコシルヒドロラーゼ活性を有し、且つ / 又は洗浄組成物及び / 若しくはプロテアーゼの存在下で安定している。本明細書中に記載されるエンド - - マンナーゼの特徴は、種々の洗浄用途及び他の工業用途での使

50

用によく適しており、例えばそこで、当該酵素は、洗剤組成物中に見出される界面活性剤、プロテアーゼ、及び/又は他の成分の存在下でマンナンを加水分解することができる。

【0020】

明確にするために以下の用語が定義される。定義されない用語及び略語は、当該技術分野において用いられている通常の意味が与えられるべきである。例えば、本明細書中で定義されない技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する（例えば、Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2d Ed., John Wiley and Sons, NY 1994; 及びHale and Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY 1991参照）。

10

【0021】

単数の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈が明確にそうでないと示さない限り、複数の言及を含む。

【0022】

用語「マンナンエンド-1,4-マンノシダーゼ」、「エンド-1,4-マンナーゼ」、「エンド-1,4-マンナーゼB」、「1,4-マンナン4-マンナノヒドロラーゼ」、「1,4-D-マンナーゼ」、「1,4-D-マンナンマンナノヒドロラーゼ」、又は「エンド-マンナーゼ」(EC 3.2.1.78)は、マンナン、ガラクトマンナン、及びグルコマンナン中の1,4-Dマンノシド結合のランダムな加水分解が可能な酵素を指す。エンド-1,4-マンナーゼは、グリコシルヒドロラーゼのいくつかのファミリーのメンバーであり、GH26及びGH5が挙げられる。特に、エンド-マンナーゼは、マンナンを分解させる一群のポリサッカラーゼを構成し、そして、マンノース単位を含有するポリオース鎖を切断することができる（すなわち、マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、及びガラクトグルコマンナン中のグリコシド結合を切断することができる）酵素を意味する。本明細書中で記載される「エンド-マンナーゼ」は、追加的な酵素活性（例えば、エンド-1,4-グルカナーゼ、1,4-マンノシダーゼ、及びセロデキストリナーゼ活性）を有し得る。

20

30

【0023】

用語「マンナーゼ」、「マンノシド酵素」、「マンノース分解酵素」、「マンナーゼ酵素」、「マンナーゼポリペプチド」、又は「マンナーゼタンパク質」は、マンナンを分解させることができる酵素、ポリペプチド、又はタンパク質を指す。マンナーゼ酵素は、例えば、エンド-マンナーゼ、エキソ-マンナーゼ、又はグリコシルヒドロラーゼであってよい。本明細書中で用いられるマンナーゼ活性は、当該技術分野において知られているあらゆる手順に従って判定されてよい（例えば、Lever, Anal. Biochem, 47:273, 1972; Eriksson and Wineill, Acta Chem. Scand., (1968), 22:1924; 米国特許第6602842号明細書; 及び国際公開第95/35362A1号パンフレット参照）。

40

【0024】

本明細書中で用いられる「マンナン」は、-1,4結合したマンノースで構成される骨格を有する多糖である; 「グルコマンナン」は、多かれ少なかれ規則正しく交互になっている、-1,4結合したマンノース及びグルコースの骨格を有する多糖である; 「ガラクトマンナン」及び「ガラクトグルコマンナン」は、アルファ-1,6結合したガラクトース側枝を有するマンナン及びグルコマンナンである。これらの化合物はアセチル化されていてもよい。ガラクトマンナン及びガラクトグルコマンナンの分解は、ガラクトース側枝の完全な、又は部分的な除去によって促進される。さらに、アセチル化マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、及びガラクトグルコマンナンの分解は、完全な、又は部分的な脱アセチル化によって促進される。アセチル基は、アルカリによって、又はマン

50

ナンアセチルエステラーゼによって除去され得る。マンナーゼから、又はマンナーゼとアルファガラクトシダーゼ及び/若しくはマンナンアセチルエステラーゼとの組合せによって放出されるオリゴマーは、 - マンノシダーゼ及び/又は - グルコシダーゼによってさらに分解して、遊離マルトースを放出し得る。

【0025】

用語「**改変**」は、アミノ酸配列におけるあらゆる変化又は変更を指し、注目するアミノ酸配列の同定された位置でのアミノ酸の、出発アミノ酸とは異なるアミノ酸による置換、注目するアミノ酸配列の同定された位置でのアミノ酸の欠失、注目するアミノ酸配列の同定された位置でのアミノ酸の挿入、注目するアミノ酸配列中のアミノ酸側鎖の置換、及び/又は注目するアミノ酸配列の化学的改変が挙げられる。

10

【0026】

用語「**触媒活性**」又は「**活性**」は、定義された反応条件下での所定の基質の変換を量的に説明する。用語「**残留活性**」は、ある条件セット下での酵素の触媒活性の、異なる条件セット下での触媒活性に対する比率と定義される。用語「**比活性**」は、定義された反応条件下での酵素量あたりの触媒活性を量的に説明する。

【0027】

用語「**pH安定性**」は、安定性が最適であるpHから大きく（例えば、最適pHを1pH単位超える、又は下回るよりも）外れているpH値への限られた曝露に、その活性が測定可能である条件下でその活性を失うことなく耐えるタンパク質の能力を説明する。

【0028】

用語「**洗剤安定性**」は、洗剤組成物混合物中での指定された洗剤組成物成分（例えば加水分解酵素）の安定性を指す。

20

【0029】

用語「**ペルヒドロラーゼ**」は、洗淨、漂白、及び消毒等の用途に適した過酸の形成をもたらす反応を触媒することができる酵素を指す。

【0030】

フレーズ「**水性組成物**」及び「**水性環境**」に用いられる用語「**水性**」は、少なくとも50%水で構成される組成物を指す。水性組成物は、水を少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%又は99%含有し得る。

【0031】

用語「**界面活性剤**」は、表面活性品質を有すると当該技術分野において一般に認識されているあらゆる化合物を指す。界面活性剤として一般に、陰イオン性化合物、陽イオン性化合物、非イオン性化合物、及び双性イオン性化合物が挙げられ、これらは本明細書中でさらに説明される。

30

【0032】

用語「**表面特性**」は、タンパク質の表面によって示される静電荷、並びに疎水性及び親水性等の特性に関して用いられる。

【0033】

用語「**キレート安定性**」は、本開示のエンド - - マンナーゼが、例えばキレート剤に曝され、又はこれと接触しながら、本明細書中で開示されるマンノシル化プロセス、加水分解プロセス、洗淨プロセス、又は他のプロセスの間の支配的な条件下で所定の期間にわたって、指定された量の酵素活性を保持することを指す。一部の実施形態において、マンナーゼは、例えば、少なくとも約10分、約20分、約40分、約60分、約100分その他の所定の期間にわたるキレート剤との接触後、マンナーゼ活性を少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約92%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%保持する。

40

【0034】

用語「**熱安定性**」及び「**熱安定の**」は、マンナーゼが、例えば、高温に曝されながら、マンノシル化プロセス、加水分解プロセス、洗淨プロセス、又は他のプロセスの間の支配的な条件下で所定の期間にわたって高温に曝された後に、指定された量の酵素活性を保

50



持することを指す。一部の実施形態において、マンナーゼは、例えば、少なくとも約5分、10分、15分、20分、30分、40分、50分、60分、120分、180分、240分、300分その他の所定の期間にわたって、高温、例えば、少なくとも約50、約55、約60、約65、又は約70に曝された後に、マンナーゼ活性を少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約92%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%保持する。

【0035】

用語「洗浄活性」は、本明細書中で開示されるマンノシル化プロセス、加水分解プロセス、洗浄プロセス、又は他のプロセスの間の支配的な条件下で、エンド-マンナーゼによって達成される洗浄性能を指す。一部の実施形態において、洗浄性能は、食品、家庭用剤、又はパーソナルケア製品から生じた酵素感受性の染みに関する種々の洗浄アッセイの利用によって判定される。これらの染みの一部として、例えば、標準的な洗い条件に染みを曝した後の種々のクロマトグラフィ、分光測光法、又は他の定量的方法論によって判定される、アイスクリーム、ケチャップ、BBQソース、マヨネーズ、スープ、チョコレートミルク、チョコレートプリン、冷凍デザート、シャンプー、ボディローション、サンプロテクション製品、練り歯みがき、ローカストビーンガム、又はグアーガムが挙げられる。例示的なアッセイとして、以下に限定されないが、国際公開第99/34011号パンフレット、米国特許第6605458号明細書、及び米国特許第6566114号明細書に記載されるもの、並びに実施例に記載される方法が挙げられる。

【0036】

用語「クリーンな表面」及び「クリーンな織物」は、染み除去パーセントが、汚された表面又は織物の少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、又は40%である表面又は織物をそれぞれ指す。

【0037】

マンナーゼ変異体又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片と併せて用いられる場合の用語「有効量」は、指定された洗浄組成物中で所望されるレベルの酵素活性を達成するのに必要とされるマンナーゼ変異体又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の量を指す。そのような有効量は、当業者によって容易に確認され、そして多くの因子、例えば、用いられる特定のマンナーゼ変異体又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片、洗浄用途、洗浄組成物の特定の組成に、そして液体組成物又は乾燥組成物（例えば、顆粒、バー、粉末、固体、液体、タブレット、ゲル、ペースト、泡、シート、又は単位用量）が必要とされるかに基づく。

【0038】

洗浄組成物と併せて用いられる場合の用語「補助剤成分」は、所望される洗浄組成物の特定のタイプ、及び製品の形態（例えば、液体、顆粒、粉末、バー、ペースト、スプレー、タブレット、ゲル、単位用量、シート、又は泡の組成物）について選択されるあらゆる液体、固体、又は気体の材料を意味し、当該材料もまた好ましくは、組成物に用いられるマンナーゼ変異体又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片と適合する。一部の実施形態において、顆粒状組成物は、「コンパクトな」形態であり、他の実施形態において、液体組成物は、「濃縮した」形態である。

【0039】

用語「洗浄組成物」及び「洗浄製剤」は、洗浄されることになるアイテム又は表面、例えば布地、皿、コンタクトレンズ、固体表面、毛髪、皮膚、及び歯からの不所望の化合物（例えば、汚れ又は染み）の除去に用いられる化学成分の混合物を指す。洗浄されることになる表面又はアイテム、及び組成物又は製剤の所望される形態に応じて、組成物又は製剤は、液体、ゲル、顆粒、粉末、バー、ペースト、スプレー、タブレット、ゲル、単位用量、シート、又は泡の形態であってよい。

【0040】

用語「洗剤組成物」及び「洗剤製剤」は、汚された物体の洗浄用の洗い媒体に用いることが意図される化学成分の混合物を指す。洗剤組成物/製剤は一般に、少なくとも1つの

10

20

30

40

50

界面活性剤を含み、そして場合によっては、加水分解酵素、酸化還元酵素、ビルダー、漂白剤、漂白活性化剤、青味剤、蛍光色素、固化阻害剤、マスキング剤、酵素活性化剤、酸化防止剤、及び可溶化剤を含んでよい。

【 0 0 4 1 】

用語「食器洗い組成物」は、皿類及びカトラリーを洗浄するための、例えば、顆粒、単位用量、及び液体の形態が挙げられる組成物の全ての形態を指す。一部の実施形態において、食器洗い組成物は、自動食器洗い機に用いられる「自動食器洗い」組成物である。用語「皿類」は、セラミックス、プラスチック、金属、磁器、ガラス、及びアクリルが挙げられるがこれらに限定されないあらゆる材料の皿（例えば、プレート、カップ、ガラス、ボウル、及びコンテナ）及びカトラリー（例えば、スプーン、ナイフ、及びフォークが挙げられるがこれらに限定されない器具）を指す。

10

【 0 0 4 2 】

用語「漂白する」は、十分な時間、そして適切な pH 及び温度の条件下での材料（例えば、布地、洗濯物、パルプその他）又は表面の、材料のブライトニング（すなわちホワイトニング）及び/又は洗浄をもたらすための処理を指す。漂白に適した化学物質の例として、以下に限定されないが、 $\text{ClO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、過酸、及び $\text{NO}_2$ が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

マンナーゼ変異体又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の用語「洗い性能」は、洗剤組成物に追加的な洗浄性能を付与する、変異体又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の、洗いへの寄与を指す。洗い性能は、関連する洗い条件下で比較される。用語「関連する洗い条件」は、本明細書中で、皿又は洗濯洗剤の市場区分における、家庭で実際に用いられる条件、特に洗い温度、時間、洗い機構、泡濃度、洗剤のタイプ、及び水硬度を示すのに用いられる。

20

【 0 0 4 4 】

本明細書中で用いられる用語「殺菌」は、表面からの汚染物質の除去、並びにアイテムの表面上の微生物の阻害又は死滅を指す。

【 0 0 4 5 】

本明細書中の洗浄組成物の「コンパクトな」形態は、密度によって、そして組成に関しては無機フィラー塩の量によって、最も良く反映される。無機フィラー塩は、粉末形態の洗剤組成物の従来の成分である。従来の洗剤組成物において、フィラー塩は、かなりの量で、典型的には総組成物の約 17 ~ 約 35 重量%の量で存在する。それに対して、コンパクトな組成物において、フィラー塩は、総組成物の約 15 % 以下の量で存在する。一部の実施形態において、フィラー塩は、組成物の約 10 重量%以下、より好ましくは約 5 重量%以下の量で存在する。一部の実施形態において、無機フィラー塩は、アルカリ金属及びアルカリ土類金属の硫酸塩及び塩化物塩から選択される。一部の実施形態において、好ましいフィラー塩は、硫酸ナトリウムである。

30

【 0 0 4 6 】

用語「布地」は、例えば、布、ニット、及び不織材料、そして例えば、糸及び布、ニット、並びに不織布に変換され得るステープルファイバー及びフィラメントを指す。当該用語は、天然繊維、及び合成（例えば人造）繊維から製造される材料を包含する。

40

【 0 0 4 7 】

核酸又はポリヌクレオチドが「単離される」とは、以下に限定されないが、例えば、他のタンパク質、核酸、及び細胞が挙げられる他の成分から少なくとも部分的に、又は完全に分離されている場合である。同様に、ポリペプチド、タンパク質、又はペプチドが「単離される」とは、以下に限定されないが、例えば、他のタンパク質、核酸、及び細胞が挙げられる他の成分から少なくとも部分的に、又は完全に分離されている場合である。モルベースで、単離された種は、組成物中の他の種よりも豊富である。例えば、単離された種は、存在する全ての高分子種の少なくとも約 60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（モルベース）を構成し得る。好ましくは、注目する種は、必要な

50

均一性となるように精製される（すなわち、汚染物質種が、従来の検出方法によって組成物中に検出され得ない）。純度及び均一性は、当該技術分野において周知のいくつかの技術、例えば、核酸サンプル又はタンパク質サンプルのそれぞれアガロース電気泳動又はポリアクリルアミドゲル電気泳動に続く、染色直後の視覚化を用いて、判定され得る。所望される場合、高分解能の技術、例えば、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）又は類似の手段が、物質の精製に利用されてよい。

【0048】

核酸又はポリペプチドに用いられる用語「精製された」は、一般に、当該技術分野において周知の分析技術によって判定されて、他の成分が本質的にない核酸又はポリペプチドを意味する（例えば、精製されたポリペプチド又はポリヌクレオチドは、電気泳動ゲル、クロマトグラフィ溶出液、及び/又は密度勾配遠心分離に曝された媒体において、不連続なバンドを形成する）。例えば、電気泳動ゲル中に本質的に1つのバンドが生じる核酸又はポリペプチドは、「精製されている」。精製された核酸又はポリペプチドは、少なくとも約50%純粋であり、通常、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、又は99.8%以上純粋である（例えば、モルベースでの重量パーセント）。これに関連して、精製技術又は富化技術の利用後に分子の濃度が実質的に増大している場合、組成物は分子について富化されている。用語「富化される」は、出発組成物におけるよりも高い相対濃度又は絶対濃度にて組成物中に存在する化合物、ポリペプチド、細胞、核酸、アミノ酸、又は他の特定の材料若しくは成分を指す。

【0049】

本明細書中で用いられる「ポリペプチド」は、ペプチド結合により結合する複数のアミノ酸を含む分子を指す。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、互換的に用いられる。タンパク質は、場合によっては、官能性を付加するように改変（例えば、グリコシル化、リン酸化、アシル化、ファルネシル化、プレニル化、そしてスルホン化）されてよい。そのようなアミノ酸配列は、活性を示す場合、「酵素」と呼ばれ得る。アミノ酸残基についての従来の1文字コード又は3文字コードが用いられ、アミノ酸配列は、標準的なアミノ末端からカルボキシ末端の向き（すなわち、N C）に示される。

【0050】

用語「ポリヌクレオチド」は、ポリペプチドをコードすることができるDNA、RNA、ヘテロ二本鎖、及び合成分子を包含する。核酸は一本鎖であっても二本鎖であってもよいし、化学改変を有してもよい。用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、互換的に用いられる。遺伝コードが縮重するので、複数のコドンが、特定のアミノ酸をコードするのに用いられ得、そして本組成物及び本方法は、特定のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を包含する。特に明記されない限り、核酸配列は、5'から3'の向きに示される。

【0051】

本明細書中で用いられる用語「野生型」及び「固有の」は、自然界に見出されるポリペプチド又はポリヌクレオチドを指す。

【0052】

ポリペプチドに関して、用語「野生型」及び「親の」は、1つ又は複数のアミノ酸位置にて人工的な置換、挿入、又は欠失を含まない、天然に存在するポリペプチドを指す。同様に、ポリヌクレオチドに関して、用語「野生型」及び「親の」は、1つ又は複数のヌクレオチドにて人工的な置換、挿入、又は欠失を含まない、天然に存在するポリヌクレオチドを指す。しかしながら、野生型又は親のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチドに限定されず、野生型又は親のポリペプチドをコードするあらゆるポリヌクレオチドを包含することを強調する。

【0053】

ポリペプチドに関して、用語「基準」は、1つ又は複数のアミノ酸位置にて人工的な置換、挿入、又は欠失を含まない、天然に存在するポリペプチド、及び1つ又は複数のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸位置にて1つ又は複数の人工的な置換、挿入、又は欠失を含むポリペプチドを指す。同様に、ポリヌクレオチドに関して、用語「基準」は、1つ又は複数のヌクレオチドの人工的な置換、挿入、又は欠失を含まない、天然に存在するポリヌクレオチド、及び1つ又は複数のヌクレオチドにて1つ又は複数の人工的な置換、挿入、又は欠失を含むポリヌクレオチドを指す。しかしながら、野生型又は親のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチドに限定されず、野生型又は親のポリペプチドをコードするあらゆるポリヌクレオチドを包含することを強調する。

#### 【0054】

1文字コード「Z」は、親又は基準のアミノ酸配列において、挿入又は欠失を同定する。親又は基準の配列に対する挿入について、1文字コード「Z」は、位置番号の左側にあり、そしてさらに、その中に挿入される各アミノ酸の前に、挿入の順位を示す数字（例えば、.01）を含む。例えば、位置298での一アミノ酸、グルタミン（Q）の挿入は、「Z298.01Q」と表されることとなる；位置298での一アミノ酸X（Xはあらゆるアミノ酸であってよい）の挿入は、「Z298.01X」と表されることとなる；そして、位置87と88の間への3つのアミノ酸、アラニン（A）、セリン（S）、及びチロシン（Y）の挿入は、「Z87.01A/Z87.02S/Z87.03Y」と表されることとなる。欠失について、1文字コード「Z」は、位置番号の右側にある。例えば、位置100からのアラニン（A）の欠失は、A100Zと表されることとなる。先の挿入及び欠失のいくつかの組合せが、以下のように表されることとなる：「G87S/Z87.01A/Z87.02S/Z87.03Y/A100Z」。

#### 【0055】

用語「マンナーゼ変異体」は、1つ又は複数のアミノ酸の置換、付加、又は欠失によって、典型的には組換えDNA技術によって基準ポリペプチドから得られるポリペプチドを指す。マンナーゼ変異体は、少数のアミノ酸残基が基準ポリペプチドと異なってよく、そして、触媒ドメインの全長にわたる、基準ポリペプチドとの一次アミノ酸配列の相同性/同一性のレベルによって定義されてよい。例えば、マンナーゼ変異体は、基準ポリペプチドとのアミノ酸配列同一性が、少なくとも59%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。基準ポリペプチドとして、マンナーゼ（エンド-1,4-マンノシダーゼ、EC 3.2.1.78）のGH5\_\_8サブファミリー内の天然に存在するマンナーゼ及び組換えマンナーゼが挙げられる。このGH5\_\_8サブファミリーは、Aspeborg et al (2012), 「Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycosyl hydrolase family 5 (GH5)」, BMC Evolutionary Biology, 12: 186においてより完全に記載されている。例示的なGH5\_\_8細菌のマンナーゼとして、例えば、NDL-Cladeマンナーゼ、例えば、PspMan4（配列番号14）及びPspMan9（配列番号30）；並びに他のマンナーゼ、例えば、バチルス属種（Bac. sp.）1WKY\_\_A（BAD99527.1）（配列番号43）、B.アガラドハエレンス（B. agaradhaerens）2WHL\_\_A（Q5YEX6の残基30~330）（配列番号45）、WO2015022428-0015（配列番号44）、US6566114-002の残基32~330（配列番号160）、及びUS6566114-002の残基32~340（配列番号162）が挙げられる。マンナーゼのNDL-Cladeは、2015年7月10日出願の国際特許出願PCT/US15/40057号明細書（後に国際公開第2016/007929号パンフレットとして公開）においてより完全に記載されている。

#### 【0056】

用語「変異ポリヌクレオチド」は、マンナーゼ変異体をコードし、親ポリヌクレオチドとの指定された程度の相同性/同一性を有し、又は親ポリヌクレオチド若しくはその相

10

20

30

40

50

補体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを指す。例えば、変異ポリヌクレオチドは、親ポリヌクレオチドとのヌクレオチド配列同一性が、少なくとも59%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。

【0057】

標準的なパラメータを用いる既知のプログラム、例えばBLAST、ALIGN、及びCLUSTALを用いて、配列同一性が判定されてよい(例えば、Altschul et al. [1990] J. Mol. Biol. 215: 403-410; Henikoff et al. [1989] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915; Karin et al. [1993] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873; 及びHiggins et al. [1988] Gene 73: 237-244参照)。BLAST分析を実行するためのソフトウェアが、国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information: NCBI)により公開されている。また、FASTAを用いて、データベースが検索されてもよい(Pearson et al. [1988] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448)。2つのポリペプチドが実質的に同一であるという1つの指示は、第1のポリペプチドが第2のポリペプチドと免疫学的に交差反応性であることである。典型的には、保存的なアミノ酸置換により異なるポリペプチドは、免疫学的に交差反応性である。従って、ポリペプチドは、例えば、2つのペプチドが、1つの保存的な置換によってのみ異なる場合、第2のポリペプチドと実質的に同一である。複数のタンパク質配列の比較に有用な別のアルゴリズムとして、Geneiousソフトウェア(Biomatters Ltd.)のMUSCLEプログラムがある(Robert C. Edgar. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput Nucl. Acids Res. (2004) 32(5): 1792-1797)。

【0058】

用語「に由来する」は、用語「に起源する」、「から得られる」、「から入手できる」、「から単離される」、及び「から生じる」を包含し、一般に、指定されたある材料が、指定された別の材料にその起源があるのを見出すことを、又は指定された別の材料に関して記載され得る特徴を有することを示す。

【0059】

用語「ハイブリダイゼーション」は、当該技術分野において知られているように、核酸の鎖が、塩基対形成により相補鎖と結合するプロセスを指す。

【0060】

用語「ハイブリダイゼーション条件」は、ハイブリダイゼーション反応が行われる条件を指す。当該条件は典型的に、ハイブリダイゼーションが評価される条件の「ストリンジェンシー」の程度によって分類される。ストリンジェンシーの程度は、例えば、核酸に結合する複合体又はプローブの融解温度( $T_m$ )に基づいてよい。例えば、「最大ストリンジェンシー」は、典型的に、 $T_m - 5$  (プローブの $T_m$ を5 下回る)くらいで; 「高ストリンジェンシー」は、 $T_m$ を約5 ~ 10 下回って; 「中程度のストリンジェンシー」は、プローブの $T_m$ を約10 ~ 20 下回って; そして「低ストリンジェンシー」は、 $T_m$ を約20 ~ 25 下回って、起こる。代わりに、又は加えて、ハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーションの塩若しくはイオンの強度条件、並びに/又は1つ若しくは複数のストリンジェンシー洗い、例えば6 x SSC = 非常に低いストリンジェンシー; 3 x SSC = 低~中程度のストリンジェンシー; 1 x SSC = 中程度のストリンジェンシー; 及び0.5 x SSC = 高ストリンジェンシーに基づいてよい。機能的に、最大ストリンジェンシー条件は、ハイブリダイゼーションプローブと厳密な同一性又はほぼ厳密な同一性を有する核酸配列を同定するのに用いられ得る; 一方、高ストリンジェンシー条

件は、プローブと約80%以上の配列同一性を有する核酸配列を同定するのに用いられる。高い選択性を必要とする用途については、ハイブリッドを形成するために比較的ストリジエントな条件を用いる(例えば、比較的低い塩及び/又は高い温度条件が用いられる)ことが典型的に所望される。

#### 【0061】

少なくとも2つの核酸又はポリペプチドの文脈における用語「実質的に類似した」及び「実質的に同一の」は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドが、親配列若しくは基準配列との同一性が少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%である配列、又は、官能性を付加することなく本記載を回避するためだけになされたアミノ酸の置換、挿入、欠失、若しくは改変を含む配列のいずれかを含むことを意味する。

10

#### 【0062】

用語「発現ベクター」は、指定されたポリペプチドをコードして、適切な宿主においてポリペプチドの発現をもたらすことができる適切な制御配列に作動可能に結合されたDNA配列を含有するDNA構築物を指す。そのような制御配列は、転写をもたらすプロモーター、そのような転写を制御する任意選択のオペレータ配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終結を制御する配列を含む。ベクターは、プラスミドであってもファージ粒子であってもよいし、単純に、潜在的なゲノム挿入物であってもよい。一旦適切な宿主に形質転換されれば、ベクターは、宿主ゲノムと独立して複製且つ機能してもよいし、場合によっては、それ自体ゲノム中に組み込んでよい。

20

#### 【0063】

用語「組換え体」は、例えば、変更されたポリペプチドを生産するようにコード配列を突然変異させることによって、コード配列を別の遺伝子のコード配列に融合させることによって、異なるプロモーターの制御下に遺伝子を置くことによって、異種起源の生物中で遺伝子を発現させることによって、低いレベル又は高いレベルにて遺伝子を発現させることによって、条件的に、又は構成的に、その生来の発現プロフィールと異なるように遺伝子を発現させることによって、配列特性又は発現特性を変えるように改変された遺伝的材料(すなわち、核酸、これがコードするポリペプチド、並びにそのようなポリヌクレオチドを含むベクター及び細胞)を指す。通常、組換え核酸、ポリペプチド、それらに基づく細胞は、人によって、自然界に見出される関連する核酸、ポリペプチド、及び細胞と同一でないように操作されてきた。

30

#### 【0064】

用語「シグナル配列」は、ポリペプチドのN末端部分に結合した一連のアミノ酸の配列を指し、これにより、成熟形態のタンパク質の、細胞からの分泌が促進される。成熟形態の細胞外タンパク質は、分泌プロセスの間にシグナル配列が切断されて、これを欠く。

#### 【0065】

用語「選択マーカー」又は「選択可能なマーカー」は、導入された核酸又はベクターを含有する宿主の選択を容易にし得る、宿主細胞中での発現が可能な遺伝子を指す。選択可能マーカーの例として、以下に限定されないが、代謝の利点、例えば栄養的な利点を宿主細胞に付与する抗菌物質(例えば、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、又はクロラムフェニコール)及び/又は遺伝子が挙げられる。用語「選択可能な遺伝子産物」は、選択可能なマーカーが発現される細胞に、抗生物質又は薬物に対する耐性を付与する酵素活性をコードする遺伝子を指す。

40

#### 【0066】

本明細書中で用いられる用語「調節要素」は、核酸配列の発現の一部の態様を制御する遺伝的要素を指す。例えば、プロモーターは、作動可能に結合されたコード領域の転写の開始を促進する調節要素である。追加的な調節要素として、スプライシングシグナル、ポリアダニル化シグナル、及び終結シグナルが挙げられる。

#### 【0067】

用語「宿主細胞」は一般に、当該技術分野において知られている組換えDNA技術を用

50

いて構築されたベクターにより形質転換又は形質移入される原核生物宿主又は真核生物宿主を指す。形質転換された宿主細胞は、タンパク質変異体をコードするベクターを複製することができ、又は所望されるタンパク質変異体を発現することができる。タンパク質変異体のプレフォーム又はプロフォームをコードするベクターの場合、そのような変異体は典型的に、発現された場合、宿主細胞から宿主細胞培地中に分泌される。

【0068】

核酸配列を細胞中に挿入する文脈における用語「導入される」は、形質転換、形質導入、又は形質移入を意味する。形質転換の手段として、当該技術分野において知られているプロトプラスト形質転換、塩化カルシウム沈殿、電気穿孔法、裸DNA等が挙げられる (Chang and Cohen [1979] Mol. Gen. Genet. 168: 111-115; Smith et al. [1986] Appl. Env. Microbiol. 51: 634; 及びFerrari et al. によるレビュー論文 (Harwood, Bacillus, Plenum Publishing Corporation, pp. 57-72, 1989) 参照)。

10

【0069】

数値と併せて用いられる場合の用語「約」は、数値の -10% ~ +10% の範囲を指す。例えば、フレーズ「約6のpH値」は、5.4から6.6のpH値を指す。

【0070】

本明細書中で用いられるあらゆる見出しは、便宜上記載されるものであり、限定として解釈されるべきでない。一見出しの下に含まれる記載は、全体として本明細書に適用され得る。

20

【0071】

本明細書中で開示される変異体、組成物、及び方法は、2つ以上の改変を含む組換えマンナナーゼ、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、そのような変異体は、従来の分子生物学技術により生じる (例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press 参照)。一実施形態において、変異マンナナーゼ、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、少なくとも1つの置換、少なくとも1つの欠失、及び少なくとも1つの挿入から選択される2つ以上の改変を含む。一部の実施形態において、改変は、突然変異の組合せ、例えば、少なくとも1つの置換及び少なくとも1つの欠失、少なくとも1つの欠失及び少なくとも1つの挿入、少なくとも1つの挿入及び少なくとも1つの置換、又は少なくとも1つの置換、少なくとも1つの欠失、及び少なくとも1つの挿入の組合せを含む。

30

【0072】

一実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し: (i) 1、2、3、4、6、10、19、28、30、38、59、60、61、62、63、66、67、68、70、71、74、75、78、80、82、93、97、103、111、124、129、131、135、136、139、143、150、167、168、184、213、214、217、225、228、235、242、244、258、259、261、263、276、283、及び284から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置298での挿入; 変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。さらに別の実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し: (i) 1、2、3、4、6、10、19、28、30、38、59、60、62、63、66、67、68、70、71、74、75、78、80、82、93、97、103、111、124、129、131、135、136、139、143、150、167、168、184、213、214、217、225、228、235、242、244、258、259、261、263、276、283、及び284から選

40

50

択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置298での挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。さらに別の実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i)1、2、3、4、6、10、19、28、30、38、59、60、62、63、66、67、68、70、71、74、75、78、80、82、93、97、103、111、124、129、131、135、136、139、143、150、167、168、184、213、214、217、225、228、235、242、244、258、259、261、283、及び284から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置298での挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i)1、4、6、10、19、28、30、38、59、60、63、66、67、68、70、71、74、75、78、80、82、97、103、111、124、129、131、143、167、168、184、214、217、225、228、235、242、244、258、259、261、263、276、及び284から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置298での挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

10

20

## 【0073】

更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i)19、30、38、59、60、63、67、68、71、74、97、103、129、167、168、184、225、228、235、242、244、258、及び261から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置298での挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。別の実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i)19、30、38、59、60、63、67、97、103、129、167、184、225、228、235、244、258、及び261から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置298での挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、19、38、59、67、68、71、74、97、129、167、168、184、225、228、235、242、244、258、及び261から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

30

40

## 【0074】

更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i)M1X、A2X、T3X、G4X、Y6X、N10X、P19X、G28X、S30X、T38X、S59X、L60X、Y61X、T62X、K63X、L66X、N67X、A68X、K70X、N71X、N74X、V75X、Q78X、K80X、I82X、K93X、N97X、V103X、E111X、I124X、Y129X、T131X、S135X、A136X、D139X、K143X、N150X、F167X、P168X、Q184X、N213X、K214X、A217X、G225X、T228X、Y235X、

50



Q 2 4 2 X、K 2 4 4 X、S 2 5 8 X、G 2 5 9 X、N 2 6 1 X、L 2 6 3 X、F 2 7 6 X、D 2 8 3 X、及びT 2 8 4 Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置Z 2 9 8 . 0 1 Xでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) M 1 X、A 2 X、T 3 X、G 4 X、Y 6 X、N 1 0 X、P 1 9 X、G 2 8 X、S 3 0 X、T 3 8 X、S 5 9 X、L 6 0 X、T 6 2 X、K 6 3 X、L 6 6 X、N 6 7 X、A 6 8 X、K 7 0 X、N 7 1 X、N 7 4 X、V 7 5 X、Q 7 8 X、K 8 0 X、I 8 2 X、K 9 3 X、N 9 7 X、V 1 0 3 X、E 1 1 1 X、I 1 2 4 X、Y 1 2 9 X、T 1 3 1 X、S 1 3 5 X、A 1 3 6 X、D 1 3 9 X、K 1 4 3 X、N 1 5 0 X、F 1 6 7 X、P 1 6 8 X、Q 1 8 4 X、N 2 1 3 X、K 2 1 4 X、A 2 1 7 X、G 2 2 5 X、T 2 2 8 X、Y 2 3 5 X、Q 2 4 2 X、K 2 4 4 X、S 2 5 8 X、G 2 5 9 X、N 2 6 1 X、L 2 6 3 X、F 2 7 6 X、D 2 8 3 X、及びT 2 8 4 Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置Z 2 9 8 . 0 1 Xでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) M 1 X、G 4 X、Y 6 X、N 1 0 X、P 1 9 X、G 2 8 X、S 3 0 X、T 3 8 X、S 5 9 X、L 6 0 X、K 6 3 X、L 6 6 X、N 6 7 X、A 6 8 X、K 7 0 X、N 7 1 X、N 7 4 X、V 7 5 X、Q 7 8 X、K 8 0 X、I 8 2 X、N 9 7 X、V 1 0 3 X、E 1 1 1 X、I 1 2 4 X、Y 1 2 9 X、T 1 3 1 X、K 1 4 3 X、F 1 6 7 X、P 1 6 8 X、Q 1 8 4 X、K 2 1 4 X、A 2 1 7 X、G 2 2 5 X、T 2 2 8 X、Y 2 3 5 X、Q 2 4 2 X、K 2 4 4 X、S 2 5 8 X、G 2 5 9 X、N 2 6 1 X、L 2 6 3 X、F 2 7 6 X、及びT 2 8 4 Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置Z 2 9 8 . 0 1 Xでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) M 1 X、A 2 X、T 3 X、G 4 X、Y 6 X、N 1 0 X、P 1 9 X、G 2 8 X、S 3 0 X、T 3 8 X、S 5 9 X、L 6 0 X、T 6 2 X、K 6 3 X、L 6 6 X、N 6 7 X、A 6 8 X、K 7 0 X、N 7 1 X、N 7 4 X、V 7 5 X、Q 7 8 X、K 8 0 X、I 8 2 X、K 9 3 X、N 9 7 X、V 1 0 3 X、E 1 1 1 X、I 1 2 4 X、Y 1 2 9 X、T 1 3 1 X、S 1 3 5 X、A 1 3 6 X、D 1 3 9 X、K 1 4 3 X、N 1 5 0 X、F 1 6 7 X、P 1 6 8 X、Q 1 8 4 X、N 2 1 3 X、K 2 1 4 X、A 2 1 7 X、G 2 2 5 X、T 2 2 8 X、Y 2 3 5 X、Q 2 4 2 X、K 2 4 4 X、S 2 5 8 X、G 2 5 9 X、N 2 6 1 X、D 2 8 3 X、及びT 2 8 4 Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置Z 2 9 8 . 0 1 Xでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

10

20

30

40

【0075】

更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) P 1 9 X、S 3 0 X、T 3 8 X、S 5 9 X、L 6 0 X、K 6 3 X、N 6 7 X、A 6 8 X、N 7 1 X、N 7 4 X、N 9 7 X、V 1 0 3 X、Y 1 2 9 X、F 1 6 7 X、P 1 6 8 X、Q 1 8 4 X、G 2 2 5 X、T 2 2 8 X、Y 2 3 5 X、Q 2 4 2 X、K 2 4 4 X、S 2 5 8 X、及びN 2 6 1 Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置Z 2 9 8 . 0 1 Xでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応

50

によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) P19X、S30X、T38X、S59X、L60X、K63X、N67X、N97X、V103X、Y129X、F167X、Q184X、G225X、T228X、Y235X、K244X、S258X、及びN261Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z298.01Xでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) P19X、T38X、S59X、N67X、A68X、N71X、N74X、N97X、Y129X、F167X、P168X、Q184X、G225X、T228X、Y235X、Q242X、K244X、S258X、及びN261Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

【0076】

更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) X1V、X1L、X2S、X3R、X4S、X6S、X6E、X10T、X10S、X19E、X28A、X28S、X30T、X38E、X59D、X59V、X60Q、X62E、X63R、X63L、X63E、X66V、X67D、X68S、X70R、X71D、X74E、X74S、X75L、X78D、X78H、X80T、X82M、X93R、X97D、X97L、X103I、X111D、X111S、X124V、X129M、X131A、X135L、X136L、X139M、X143Q、X143R、X150T、X167Y、X168A、X168S、X184D、X184L、X213A、X214I、X217P、X225C、X225P、X228V、X235L、X242L、X244L、X258D、X259P、X261Q、X261R、X263E、X276Y、X283S、X284A、及びX284Eから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z298.01Qでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) X1V、X1L、X2S、X3R、X4S、X6S、X6E、X10T、X10S、X19E、X28A、X28S、X30T、X38E、X59D、X59V、X60Q、X61W、X62E、X63R、X63L、X63E、X66V、X67D、X68S、X70R、X71D、X74E、X74S、X75L、X78D、X78H、X80T、X82M、X93R、X97D、X97L、X103I、X111D、X111S、X124V、X129M、X131A、X135L、X136L、X139M、X143Q、X143R、X150T、X167Y、X168A、X168S、X184D、X184L、X213A、X214I、X217P、X225C、X225P、X228V、X235L、X242L、X244L、X258D、X259P、X261Q、X261R、X263E、X276Y、X283S、X284A、及びX284Eから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z298.01Qでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) X1V、X1L、X2S、X3R、X4S、X6E、X10T、X10S、X19E、X28A、X28S、X30T、X38E、

10

20

30

40

50

X 5 9 D、X 5 9 V、X 6 0 Q、X 6 2 E、X 6 3 R、X 6 3 L、X 6 6 V、X 6 7 D、  
 X 6 8 S、X 7 0 R、X 7 1 D、X 7 4 E、X 7 4 S、X 7 5 L、X 7 8 D、X 7 8 H、  
 X 8 0 T、X 8 2 M、X 9 3 R、X 9 7 D、X 9 7 L、X 1 0 3 I、X 1 1 1 D、X 1 1  
 1 S、X 1 2 4 V、X 1 2 9 M、X 1 3 1 A、X 1 3 5 L、X 1 3 6 L、X 1 3 9 M、X  
 1 4 3 Q、X 1 4 3 R、X 1 5 0 T、X 1 6 7 Y、X 1 6 8 A、X 1 6 8 S、X 1 8 4 D  
 、X 1 8 4 L、X 2 1 3 A、X 2 1 4 I、X 2 1 7 P、X 2 2 5 C、X 2 2 5 P、X 2 2  
 8 V、X 2 3 5 L、X 2 4 2 L、X 2 4 4 L、X 2 5 8 D、X 2 5 9 P、X 2 6 1 Q、X  
 2 6 1 R、X 2 8 3 S、X 2 8 4 A、及びX 2 8 4 Eから選択される1つ又は複数の位置  
 での1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置Z 2 9 8 . 0 1 Qでの挿入；Xは、あらゆる  
 アミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、  
 配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施  
 形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異  
 体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) X 1 V、X 1 L、X 2  
 S、X 3 R、X 1 0 T、X 1 9 E、X 2 8 A、X 2 8 S、X 3 0 T、X 3 8 E、X 5 9 D  
 、X 5 9 V、X 6 0 Q、X 6 2 E、X 6 3 R、X 6 3 L、X 6 6 V、X 6 7 D、X 6 8 S  
 、X 7 0 R、X 7 1 D、X 7 4 E、X 7 8 D、X 8 0 T、X 8 2 M、X 9 7 D、X 9 7 L  
 、X 1 0 3 I、X 1 1 1 D、X 1 1 1 S、X 1 2 4 V、X 1 2 9 M、X 1 3 1 A、X 1 3  
 9 M、X 1 4 3 Q、X 1 4 3 R、X 1 5 0 T、X 1 6 7 Y、X 1 6 8 A、X 1 6 8 S、X  
 1 8 4 D、X 1 8 4 L、X 2 1 3 A、X 2 1 4 I、X 2 1 7 P、X 2 2 5 C、X 2 2 5 P  
 、X 2 2 8 V、X 2 3 5 L、X 2 4 4 L、X 2 5 8 D、X 2 5 9 P、X 2 6 1 Q、X 2 6  
 1 R、X 2 8 3 S、X 2 8 4 A、及びX 2 8 4 Eから選択される1つ又は複数の位置での  
 1つ又は複数の置換、並びに(i i)位置Z 2 9 8 . 0 1 Qでの挿入；Xは、あらゆるア  
 ミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は  
 、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態  
 は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、  
 又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) X 1 V、X 4 S、X 6 S、  
 X 6 E、X 1 0 T、X 1 0 S、X 1 9 E、X 2 8 S、X 3 0 T、X 3 8 E、X 5 9 V、X  
 6 0 Q、X 6 3 R、X 6 3 L、X 6 6 V、X 6 7 D、X 6 8 S、X 7 0 R、X 7 1 D、X  
 7 4 S、X 7 5 L、X 7 8 D、X 7 8 H、X 8 0 T、X 8 2 M、X 9 7 D、X 1 0 3 I、  
 X 1 1 1 D、X 1 2 4 V、X 1 2 9 M、X 1 3 1 A、X 1 4 3 Q、X 1 4 3 R、X 1 6 7  
 Y、X 1 6 8 S、X 1 8 4 L、X 2 1 4 I、X 2 1 7 P、X 2 2 5 C、X 2 2 5 P、X 2  
 2 8 V、X 2 3 5 L、X 2 4 2 L、X 2 4 4 L、X 2 5 8 D、X 2 5 9 P、X 2 6 1 R、  
 X 2 6 3 E、X 2 7 6 Y、及びX 2 8 4 Aから選択される1つ又は複数の位置での1つ又  
 は複数の置換、並びに(i i)位置Z 2 9 8 . 0 1 Qでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸  
 であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列  
 番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

【 0 0 7 7 】

更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマン  
 ナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) X 1 9 E  
 、X 3 0 T、X 3 8 E、X 5 9 V、X 6 0 Q、X 6 3 R、X 6 3 L、X 6 3 E、X 6 7 D  
 、X 6 8 S、X 7 1 D、X 7 4 E、X 7 4 S、X 9 7 D、X 9 7 L、X 1 0 3 I、X 1 2  
 9 M、X 1 6 7 Y、X 1 6 8 A、X 1 6 8 S、X 1 8 4 D、X 1 8 4 L、X 2 2 5 C、X  
 2 2 5 P、X 2 2 8 V、X 2 3 5 L、X 2 4 2 L、X 2 4 4 L、X 2 5 8 D、X 2 6 1 Q  
 、及びX 2 6 1 Rから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(i  
 i)位置Z 2 9 8 . 0 1 Qでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はそ  
 の組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列  
 との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以  
 上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若  
 しくは活性断片に関し：(i) X 1 9 E、X 3 8 E、X 5 9 V、X 6 7 D、X 6 8 S、X  
 7 1 D、X 7 4 E、X 7 4 S、X 9 7 D、X 9 7 L、X 1 2 9 M、X 1 6 7 Y、X 1 6 8

10

20

30

40

50

A、X168S、X184D、X184L、X225C、X225P、X228V、X235L、X242L、X244L、X258D、X261Q、及びX261Rから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) X19E、X38E、X59V、X67D、X68S、X71D、X74E、X97D、X97L、X129M、X167Y、X168A、X168S、X184D、X184L、X225C、X225P、X228V、X235L、X244L、X258D、X261Q、及びX261Rから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) X19E、X30T、X38E、X59V、X60Q、X63R、X63L、X63E、X67D、X97D、X103I、X129M、X167Y、X184L、X225C、X225P、X228V、X235L、X244L、X258D、及びX261Rから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z298.01Qでの挿入；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

10

20

## 【0078】

更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) M1V、M1L、A2S、T3R、G4S、Y6S、Y6E、N10T、N10S、P19E、G28A、G28S、S30T、T38E、S59D、S59V、L60Q、Y61W、T62E、K63R、K63L、K63E、L66V、N67D、A68S、K70R、N71D、N74E、N74S、V75L、Q78D、Q78H、K80T、I82M、K93R、N97D、N97L、V103I、E111D、E111S、I124V、Y129M、T131A、T135L、A136L、D139M、K143Q、K143R、N150T、F167Y、P168A、P168S、Q184D、Q184L、N213A、K214I、A217P、G225C、G225P、T228V、Y235L、Q242L、K244L、S258D、G259P、N261Q、N261R、L263E、F276Y、D283S、T284A、及びT284Eから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z298.01Qでの挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) M1V、M1L、A2S、T3R、G4S、Y6S、Y6E、N10T、N10S、P19E、G28A、G28S、S30T、T38E、S59D、S59V、L60Q、T62E、K63R、K63L、K63E、L66V、N67D、A68S、K70R、N71D、N74E、N74S、V75L、Q78D、Q78H、K80T、I82M、K93R、N97D、N97L、V103I、E111D、E111S、I124V、Y129M、T131A、T135L、A136L、D139M、K143Q、K143R、N150T、F167Y、P168A、P168S、Q184D、Q184L、N213A、K214I、A217P、G225C、G225P、T228V、Y235L、Q242L、K244L、S258D、G259P、N261Q、N261R、L263E、F276Y、D283S、T284A、及びT284Eから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z298.01Qでの挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸

30

40

50

位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) M1V、M1L、A2S、T3R、G4S、Y6E、N10T、N10S、P19E、G28A、G28S、S30T、T38E、S59D、S59V、L60Q、T62E、K63R、K63L、L66V、N67D、A68S、K70R、N71D、N74E、N74S、V75L、Q78D、Q78H、K80T、I82M、K93R、N97D、N97L、V103I、E111D、E111S、I124V、Y129M、T131A、T135L、A136L、D139M、K143Q、K143R、N150T、F167Y、P168A、P168S、Q184D、Q184L、N213A、K214I、A217P、G225C、G225P、T228V、Y235L、Q242L、K244L、S258D、G259P、N261Q、N261R、D283S、T284A、及びT284Eから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z298.01Qでの挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) M1V、M1L、A2S、T3R、N10T、P19E、G28A、G28S、S30T、T38E、S59D、S59V、L60Q、T62E、K63R、K63L、L66V、N67D、A68S、K70R、N71D、N74E、Q78D、K80T、I82M、N97D、N97L、V103I、E111D、E111S、I124V、Y129M、T131A、D139M、K143Q、K143R、N150T、F167Y、P168A、P168S、Q184D、Q184L、N213A、K214I、A217P、G225C、G225P、T228V、Y235L、K244L、S258D、G259P、N261Q、N261R、D283S、T284A、及びT284Eから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z298.01Qでの挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) M1V、G4S、Y6S、Y6E、N10T、N10S、P19E、G28S、S30T、T38E、S59V、L60Q、K63R、K63L、K63E、L66V、N67D、A68S、K70R、N71D、N74S、V75L、Q78D、Q78H、K80T、I82M、N97D、V103I、E111D、I124V、Y129M、T131A、K143Q、K143R、F167Y、P168S、Q184L、K214I、A217P、G225C、G225P、T228V、Y235L、Q242L、K244L、S258D、G259P、N261R、L263E、F276Y、及びT284Aから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに位置Z298.01Qでの挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

【0079】

更なる実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) P19E、S30T、T38E、S59D、S59V、L60Q、K63R、K63L、K63E、N67D、A68S、N71D、N74E、N74S、N97D、N97L、V103I、Y129M、F167Y、P168A、P168S、Q184D、Q184L、G225C、G225P、T228V、Y235L、Q242L、K244L、S258D、N261Q、及びN261Rから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z298.01Qでの挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、P19E、T38E、S59D、S59V、N6

10

20

30

40

50

7 D、A 6 8 S、N 7 1 D、N 7 4 E、N 9 7 D、N 9 7 L、Y 1 2 9 M、F 1 6 7 Y、P 1 6 8 A、P 1 6 8 S、Q 1 8 4 D、Q 1 8 4 L、G 2 2 5 C、G 2 2 5 P、T 2 2 8 V、Y 2 3 5 L、K 2 4 4 L、S 2 5 8 D、N 2 6 1 Q、及びN 2 6 1 Rから選択される2つ以上の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。別の実施形態は、以下から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し：(i) P 1 9 E、S 3 0 T、T 3 8 E、S 5 9 V、L 6 0 Q、K 6 3 R、K 6 3 L、K 6 3 E、N 6 7 D、N 9 7 D、V 1 0 3 I、Y 1 2 9 M、F 1 6 7 Y、Q 1 8 4 L、G 2 2 5 C、G 2 2 5 P、T 2 2 8 V、Y 2 3 5 L、K 2 4 4 L、S 2 5 8 D、及びN 2 6 1 Rから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換、並びに(ii)位置Z 2 9 8 . 0 1 Qでの挿入；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。  
【0080】

10

別の実施形態は、1 2 9 - 2 4 4、1 2 9 - 1 4 3 - 2 4 4、3 8 - 2 5 8、3 8 - 1 4 3 - 2 5 8、1 9 - 1 8 4、1 9 - 1 4 3 - 1 8 4、9 7 - 2 2 5、9 7 - 1 4 3 - 2 2 5、6 7 - 1 6 8、6 7 - 1 4 3 - 1 6 8、6 0 - 6 1、6 3 - 7 1、6 3 - 7 1 - 1 4 3、2 2 8 - 2 3 5、及び1 4 3 - 2 2 8 - 2 3 5から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。さらに別の実施形態は、1 2 9 - 2 4 4、1 2 9 - 1 4 3 - 2 4 4、3 8 - 2 5 8、3 8 - 1 4 3 - 2 5 8、1 9 - 1 8 4、1 9 - 1 4 3 - 1 8 4、9 7 - 2 2 5、9 7 - 1 4 3 - 2 2 5、6 7 - 1 6 8、6 7 - 1 4 3 - 1 6 8、6 3 - 7 1、6 3 - 7 1 - 1 4 3、2 2 8 - 2 3 5、及び1 4 3 - 2 2 8 - 2 3 5から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、1 2 9 - 2 4 4、3 8 - 2 5 8、1 9 - 1 8 4、9 7 - 2 2 5、6 7 - 1 6 8、6 3 - 7 1、及び2 2 8 - 2 3 5から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、1 2 9 - 1 4 3 - 2 4 4、3 8 - 1 4 3 - 2 5 8、1 9 - 1 4 3 - 1 8 4、9 7 - 1 4 3 - 2 2 5、6 7 - 1 4 3 - 1 6 8、6 3 - 7 1 - 1 4 3、及び1 4 3 - 2 2 8 - 2 3 5から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、1 2 9 - 2 4 4、3 8 - 2 5 8、1 9 - 1 8 4、9 7 - 2 2 5、6 7 - 1 6 8、6 3 - 7 1、及び2 2 8 - 2 3 5から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、1 2 9 - 1 4 3 - 2 4 4、3 8 - 1 4 3 - 2 5 8、1 9 - 1 4 3 - 1 8 4、9 7 - 1 4 3 - 2 2 5、6 7 - 1 4 3 - 1 6 8、6 3 - 7 1 - 1 4 3、及び1 4 3 - 2 2 8 - 2 3 5から選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

20

30

40

50

## 【 0 0 8 1 】

別の実施形態は、Y 1 2 9 X - K 2 4 4 X、Y 1 2 9 X - K 1 4 3 X - K 2 4 4 X、T 3 8 X - S 2 5 8 X、T 3 8 X - K 1 4 3 X - S 2 5 8 X、P 1 9 X - Q 1 8 4 X、P 1 9 X - K 1 4 3 X - Q 1 8 4 X、N 9 7 X - G 2 2 5 X、N 9 7 X - K 1 4 3 X - G 2 2 5 X、L 6 0 X - Y 6 1 X、N 6 7 X - P 1 6 8 X、N 6 7 X - K 1 4 3 X - P 1 6 8 X、K 6 3 X - N 7 1 X、K 6 3 X - N 7 1 X - K 1 4 3 X、T 2 2 8 X - Y 2 3 5 X、及びK 1 4 3 X - T 2 2 8 X - Y 2 3 5 Xから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

さらに別の実施形態は、Y 1 2 9 X - K 2 4 4 X、Y 1 2 9 X - K 1 4 3 X - K 2 4 4 X、T 3 8 X - S 2 5 8 X、T 3 8 X - K 1 4 3 X - S 2 5 8 X、P 1 9 X - Q 1 8 4 X、P 1 9 X - K 1 4 3 X - Q 1 8 4 X、N 9 7 X - G 2 2 5 X、N 9 7 X - K 1 4 3 X - G 2 2 5 X、N 6 7 X - P 1 6 8 X、N 6 7 X - K 1 4 3 X - P 1 6 8 X、K 6 3 X - N 7 1 X、K 6 3 X - N 7 1 X - K 1 4 3 X、T 2 2 8 X - Y 2 3 5 X、及びK 1 4 3 X - T 2 2 8 X - Y 2 3 5 Xから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、Y 1 2 9 X - K 2 4 4 X、T 3 8 X - S 2 5 8 X、P 1 9 X - Q 1 8 4 X、N 9 7 X - G 2 2 5 X、N 6 7 X - P 1 6 8 X、K 6 3 X - N 7 1 X、及びT 2 2 8 X - Y 2 3 5 Xから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、Y 1 2 9 X - K 1 4 3 X - K 2 4 4 X、T 3 8 X - K 1 4 3 X - S 2 5 8 X、P 1 9 X - K 1 4 3 X - Q 1 8 4 X、N 9 7 X - K 1 4 3 X - G 2 2 5 X、N 6 7 X - K 1 4 3 X - P 1 6 8 X、K 6 3 X - N 7 1 X - K 1 4 3 X、及びK 1 4 3 X - T 2 2 8 X - Y 2 3 5 Xから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、Y 1 2 9 X - K 2 4 4 X、Y 1 2 9 X - K 1 4 3 X - K 2 4 4 X、T 3 8 X - S 2 5 8 X、T 3 8 X - K 1 4 3 X - S 2 5 8 X、P 1 9 X - Q 1 8 4 X、P 1 9 X - K 1 4 3 X - Q 1 8 4 X、N 9 7 X - G 2 2 5 X、N 9 7 X - K 1 4 3 X - G 2 2 5 X、N 6 7 X - P 1 6 8 X、N 6 7 X - K 1 4 3 X - P 1 6 8 X、K 6 3 X - N 7 1 X、K 6 3 X - N 7 1 X - K 1 4 3 X、T 2 2 8 X - Y 2 3 5 X、及びK 1 4 3 X - T 2 2 8 X - Y 2 3 5 Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、Y 1 2 9 X - K 2 4 4 X、T 3 8 X - S 2 5 8 X、P 1 9 X - Q 1 8 4 X、N 9 7 X - G 2 2 5 X、N 6 7 X - P 1 6 8 X、K 6 3 X - N 7 1 X、及びT 2 2 8 X - Y 2 3 5 Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。さらに別の実施形態は、Y 1 2 9 X - K 1 4 3 X - K 2 4 4 X、T 3 8 X - K 1 4 3 X - S 2 5 8 X、P 1 9 X - K 1 4 3 X - Q 1 8 4 X、N 9 7 X - K 1 4 3 X - G 2 2 5 X、N 6 7 X - K 1 4 3 X - P 1 6 8 X、K 6 3 X - N 7 1 X - K 1 4 3 X

10

20

30

40

50

、及びK 1 4 3 X - T 2 2 8 X - Y 2 3 5 Xから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

【0082】

別の実施形態は、X 1 2 9 M - X 2 4 4 L、X 1 2 9 M - X 1 4 3 Q - X 2 4 4 L、X 3 8 E - X 2 5 8 D、X 3 8 E - X 1 4 3 Q - X 2 5 8 D、X 1 9 E - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 8 4 L、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 L、X 9 7 D - X 2 2 5 C、X 9 7 D - X 1 4 3 Q - X 2 2 5 C、X 9 7 D - X 2 2 5 P、X 9 7 D - X 1 4 3 Q - X 2 2 5 P、X 6 0 Q - X 6 1 W、X 6 7 D - X 1 6 8 S、X 6 7 D - X 1 4 3 Q - X 1 6 8 S、X 6 3 L - X 7 1 D、X 6 3 L - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、X 6 3 R - X 7 1 D、X 6 3 R - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、X 2 2 8 V - X 2 3 5 L、及びX 1 4 3 Q - X 2 2 8 V - X 2 3 5 Lから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。さらに別の実施形態は、X 1 2 9 M - X 2 4 4 L、X 1 2 9 M - X 1 4 3 Q - X 2 4 4 L、X 3 8 E - X 2 5 8 D、X 3 8 E - X 1 4 3 Q - X 2 5 8 D、X 1 9 E - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 8 4 L、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 L、X 9 7 D - X 2 2 5 C、X 9 7 D - X 1 4 3 Q - X 2 2 5 C、X 9 7 D - X 2 2 5 P、X 9 7 D - X 1 4 3 Q - X 2 2 5 P、X 6 7 D - X 1 6 8 S、X 6 7 D - X 1 4 3 Q - X 1 6 8 S、X 6 3 L - X 7 1 D、X 6 3 L - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、X 6 3 R - X 7 1 D、X 6 3 R - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、X 2 2 8 V - X 2 3 5 L、及びX 1 4 3 Q - X 2 2 8 V - X 2 3 5 Lから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、X 1 2 9 M - X 2 4 4 L、X 3 8 E - X 2 5 8 D、X 1 9 E - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 8 4 L、X 9 7 D - X 2 2 5 C、X 9 7 D - X 2 2 5 P、X 6 7 D - X 1 6 8 S、X 6 3 L - X 7 1 D、X 6 3 R - X 7 1 D、及びX 2 2 8 V - X 2 3 5 Lから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、X 1 2 9 M - X 2 4 4 L、X 1 2 9 M - X 1 4 3 Q - X 2 4 4 L、X 3 8 E - X 1 4 3 Q - X 2 5 8 D、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 L、X 9 7 D - X 1 4 3 Q - X 2 2 5 C、X 9 7 D - X 1 4 3 Q - X 2 2 5 P、X 6 7 D - X 1 4 3 Q - X 1 6 8 S、X 6 3 L - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、X 6 3 R - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、及びX 1 4 3 Q - X 2 2 8 V - X 2 3 5 Lから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、X 1 2 9 M - X 2 4 4 L、X 1 2 9 M - X 1 4 3 Q - X 2 4 4 L、X 3 8 E - X 2 5 8 D、X 3 8 E - X 1 4 3 Q - X 2 5 8 D、X 1 9 E - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 D、X 1 9 E - X 1 8 4 L、X 1 9 E - X 1 4 3 Q - X 1 8 4 L、X 9 7 D - X 2 2 5 C、X 9 7 D - X 2 2 5 P、X 9 7 D - X 1 4 3 Q - X 2 2 5 P、X 6 7 D - X 1 6 8 S、X 6 7 D - X 1 4 3 Q - X 1 6 8 S、X 6 3 L - X 7 1 D、X 6 3 L - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、X 6 3 R - X 7 1 D、X 6 3 R - X 7 1 D - X 1 4 3 Q、X 2 2 8 V - X 2 3 5 L、及びX 1 4 3 Q - X 2 2 8 V - X 2 3 5 Lから選択される1つ又

10

20

30

40

50



は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。別の実施形態は、X129M - X244L、X38E - X258D、X19E - X184D、X19E - X184L、X97D - X225C、X97D - X225P、X67D - X168S、X63L - X71D、X63R - X71D、及びX228V - X235Lから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。さらに別の実施形態は、X129M - X143Q - X244L、X38E - X143Q - X258D、X19E - X143Q - X184D、X19E - X143Q - X184L、X97D - X143Q - X225C、X97D - X143Q - X225P、X67D - X143Q - X168S、X63L - X71D - X143Q、X63R - X71D - X143Q、及びX143Q - X228V - X235Lから選択される1つ又は複数の位置での1つ又は複数の置換から選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、Xは、あらゆるアミノ酸であり；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

10

20

## 【0083】

別の実施形態は、Y129M - K244L、Y129M - K143Q - K244L、T38E - S258D、T38E - K143Q - S258D、P19E - Q184D、P19E - K143Q - Q184D、P19E - Q184L、P19E - K143Q - Q184L、N97D - G225C、N97D - K143Q - G225C、N97D - G225P、N97D - K143Q - G225P、L60Q - Y61W、N67D - P168S、N67D - K143Q - P168S、K63L - N71D、K63L - N71D - K143Q、K63R - N71D、K63R - N71D - K143Q、T228V - Y235L、及びK143Q - T228V - Y235Lから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。さらに別の実施形態は、Y129M - K244L、Y129M - K143Q - K244L、T38E - S258D、T38E - K143Q - S258D、P19E - Q184D、P19E - K143Q - Q184D、P19E - Q184L、P19E - K143Q - Q184L、N97D - G225C、N97D - K143Q - G225C、N97D - G225P、N97D - K143Q - G225P、N67D - P168S、N67D - K143Q - P168S、K63L - N71D、K63L - N71D - K143Q、K63R - N71D、K63R - N71D - K143Q、T228V - Y235L、及びK143Q - T228V - Y235Lから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、Y129M - K244L、T38E - S258D、P19E - Q184D、P19E - Q184L、N97D - G225C、N97D - G225P、N67D - P168S、K63L - N71D、K63R - N71D、及びT228V - Y235Lから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、Y129M - K143Q - K244L、T38E - K143Q - S258D、P19E - K143Q - Q184D、P19E - K

30

40

50

1 4 3 Q - Q 1 8 4 L、N 9 7 D - K 1 4 3 Q - G 2 2 5 C、N 9 7 D - K 1 4 3 Q - G 2 2 5 P、N 6 7 D - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S、K 6 3 L - N 7 1 D - K 1 4 3 Q、K 6 3 R - N 7 1 D - K 1 4 3 Q、及びK 1 4 3 Q - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 Lから選択される2つ以上の改変を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

【0084】

更なる実施形態は、P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P；P 1 9 E - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Q 2 4 2 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P；N 1 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - L 6 6 V - A 6 8 S - N 7 4 S - V 7 5 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L；P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R；N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；N 1 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q；P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - Q 7 8

10

20

30

40

50

D - K 8 0 T - N 9 7 D - I 1 2 4 V - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4  
L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q  
; N 1 0 S - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 6 7 D  
- Q 7 8 H - K 8 0 T - I 8 2 M - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q  
1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 .  
0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N  
6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T  
2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; G 4  
S - N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2  
9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N  
2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L  
6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M -  
T 1 3 1 A - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8  
D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9  
V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1  
1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K  
2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E  
- S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1  
8 4 L - K 2 1 4 I - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R -  
Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K  
6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2  
2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0  
1 Q ; M 1 V - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8  
D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - F 1 6 7 Y - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2  
5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 A - Z 2 9 8 . 0 1  
Q ; Y 6 E - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D  
- N 7 1 D - N 9 7 D - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - S 1 3 5 L - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L  
- G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - D 2 8  
3 S - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0  
Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q -  
P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8  
D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; A 2 S - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E  
- K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 7 4 E - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - N 1 5  
0 T - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S  
2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 L - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S  
3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M -  
A 1 3 6 L - P 1 6 8 A - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4  
L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - K 6  
3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2  
5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1  
Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7  
D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2  
5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; T 3 R - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3  
0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 L - E 1 1 1 S - Y  
1 2 9 M - D 1 3 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L  
- S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0  
T - T 3 8 E - S 5 9 D - N 6 7 D - A 6 8 S - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2  
9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 D - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S  
2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 E - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D  
- Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - N 6 7 D

10

20

30

40

50

- N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; 又は P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

10

## 【 0 0 8 5 】

更なる実施形態は、 P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; A 2 S - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 7 4 E - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - N 1 5 0 T - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; T 3 R - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 L - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - D 1 3 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; 又は N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 D - N 6 7 D - A 6 8 S - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 D - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 E - Z 2 9 8 . 0 1 Q を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

20

30

40

## 【 0 0 8 6 】

更なる実施形態は、 N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8

50

S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - N  
 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2  
 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E  
 - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2  
 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0  
 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7  
 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2  
 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T  
 - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6  
 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 1 4 I - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N  
 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L  
 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8  
 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z  
 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 V - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1  
 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - F 1 6 7 Y - P 1 6 8 S - Q 1 8 4  
 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 A - Z 2  
 9 8 . 0 1 Q ; Y 6 E - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L  
 - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - S 1 3 5 L - P 1 6 8 S -  
 Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1  
 Q - D 2 8 3 S - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9  
 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K  
 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L  
 - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; A 2 S - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T  
 - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 7 4 E - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9  
 M - N 1 5 0 T - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2  
 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; T 3 R - N 1 0 T - P 1 9 E - G  
 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 L - E  
 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - D 1 3 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L  
 - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2  
 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 D - N 6 7 D - A 6 8 S - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9  
 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 D - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K  
 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 E - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - N 6 7  
 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L -  
 K 2 4 4 L ; 又は P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L  
 - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換え  
 ポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは  
 活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けら  
 れている。

## 【 0 0 8 7 】

更なる実施形態は、 P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4  
 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8  
 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 D  
 - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L ; P 1 9 E -  
 T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S  
 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T  
 - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1  
 R ; T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C -  
 T 2 2 8 V - Q 2 4 2 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - K 6 3 L -  
 N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D -  
 G 2 5 9 P ; N 1 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - L 6 6 V - A 6 8 S

10

20

30

40

50

- N 7 4 S - V 7 5 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L -  
A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8  
. 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - F 1 6 7  
Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; T 3 8 E - K 6 3  
L - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L -  
K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P  
1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - N 6 7 D - N  
9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - K 6  
3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2  
5 8 D - N 2 6 1 R ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - N 6 7 D -  
N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L -  
K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9  
V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q -  
F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1  
R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T  
- N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8  
D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3  
L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - Q  
1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R  
- Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I  
- Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4  
4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N  
6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 L - A 2 1  
7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z  
2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 9  
7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K  
2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E  
- S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1  
6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D -  
N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q -  
K 6 3 R - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - I 1 2 4 V - Y 1 2 9 M - K 1 4  
3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N  
2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 S - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L  
6 0 Q - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 H - K 8 0 T - I 8 2 M - N 9 7 D - Y 1 2 9 M -  
K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8  
D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9  
V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S -  
Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1  
R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; G 4 S - N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D -  
K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L -  
K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0  
T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0  
T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - T 1 3 1 A - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3  
5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E -  
S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D -  
K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C -  
T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P  
1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y  
1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 1 4 I - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L  
- S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8

10

20

30

40

50

E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P  
 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D  
 - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 V - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E -  
 N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - F 1 6 7 Y - P 1  
 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R -  
 T 2 8 4 A - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; Y 6 E - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T  
 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - S 1 3 5  
 L - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2  
 5 8 D - N 2 6 1 Q - D 2 8 3 S - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T -  
 T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I 10  
 - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3  
 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; A 2 S - P 1 9 E - G  
 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 7 4 E - K 9 3 R - N  
 9 7 D - Y 1 2 9 M - N 1 5 0 T - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C -  
 Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 L - N 1 0  
 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8  
 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - A 1 3 6 L - P 1 6 8 A - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2  
 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E  
 - T 3 8 E - S 5 9 V - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1  
 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - 20  
 N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E -  
 K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y  
 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; T 3 R - N 1 0 T  
 - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - K 9 3 R  
 - N 9 7 L - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - D 1 3 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5  
 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T -  
 P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 D - N 6 7 D - A 6 8 S - N 7 1 D -  
 K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 D - G 2 2 5 C -  
 Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 E - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P  
 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 30  
 4 4 L ; P 1 9 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M -  
 P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P  
 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1  
 2 9 M - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7  
 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P  
 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4  
 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - P 1 6  
 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; 又  
 は P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K  
 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又は  
 その組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド  
 若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号  
 を付けられている。

【 0 0 8 8 】

更なる実施形態は、P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D -  
 N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C  
 - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P  
 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q  
 - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5  
 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 50

0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - I 1 2 4 V - Y 1 2 9 M -  
 K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8  
 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 S - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9  
 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 H - K 8 0 T - I 8 2 M - N 9 7 D - Y 1 2  
 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S  
 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E -  
 S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6  
 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N  
 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L  
 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8  
 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z  
 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6  
 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8  
 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2  
 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; 又は N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E -  
 S 5 9 D - N 6 7 D - A 6 8 S - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3  
 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 D - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2  
 6 1 R - T 2 8 4 E - Z 2 9 8 . 0 1 Q を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、  
 又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプ  
 チド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって  
 番号を付けられている。

10

20

## 【 0 0 8 9 】

別の実施形態は、 P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L  
 - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y  
 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E -  
 T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8  
 S - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D  
 - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Q 2 4 2 L - K 2 4 4  
 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; N 1 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - L  
 6 6 V - A 6 8 S - N 7 4 S - V 7 5 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7  
 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2  
 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1  
 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ;  
 T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8  
 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D  
 - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9  
 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V  
 - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Q  
 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D  
 - N 2 6 1 R ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1  
 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4  
 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L  
 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6  
 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z  
 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9  
 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N  
 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K  
 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4  
 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2  
 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1

30

40

50



2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L -  
S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D  
- Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P -  
G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8  
. 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 9 7 D -  
V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4  
L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5  
9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y  
- Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6  
1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3  
R - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - I 1 2 4 V - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q -  
F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1  
R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 S - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q  
- K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 H - K 8 0 T - I 8 2 M - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4  
3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N  
2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L  
6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8  
4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z  
2 9 8 . 0 1 Q ; G 4 S - N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0  
T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4  
4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T  
3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N  
9 7 D - Y 1 2 9 M - T 1 3 1 A - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L -  
K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0  
T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0  
T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2  
8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E  
- S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9  
M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 1 4 I - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2  
5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S  
5 9 V - 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S  
- Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6  
1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 V - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D  
- N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - F 1 6 7 Y - P 1 6 8 S -  
Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4  
A - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; Y 6 E - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E -  
K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - S 1 3 5 L - P 1  
6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D -  
N 2 6 1 Q - D 2 8 3 S - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E  
- S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2  
9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K  
2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; A 2 S - P 1 9 E - G 2 8 S -  
S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 7 4 E - K 9 3 R - N 9 7 D -  
Y 1 2 9 M - N 1 5 0 T - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5  
L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 L - N 1 0 T - P 1  
9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9  
7 D - Y 1 2 9 M - A 1 3 6 L - P 1 6 8 A - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y  
2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8  
E - S 5 9 V - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y -  
Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1

10

20

30

40

50

R - Z 2 9 8 . 0 1 ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; T 3 R - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 L - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - D 1 3 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 D - N 6 7 D - A 6 8 S - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 D - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 E - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; 又は P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R を含むアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

10

## 【 0 0 9 0 】

さらに別の実施形態は、 P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - I 1 2 4 V - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 S - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 H - K 8 0 T - I 8 2 M - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4

20

30

40

50

3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S  
 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; G 4 S - N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N  
 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2  
 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T  
 - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D  
 - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - T 1 3 1 A - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L -  
 G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N  
 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N  
 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8  
 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z  
 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6  
 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 1 4 I - G 2 2 5 C - Y 2  
 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E  
 - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9  
 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2  
 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 V - P 1 9 E - S 3 0 T - T  
 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R  
 - F 1 6 7 Y - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5  
 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 A - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; Y 6 E - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2  
 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - E 1 1 1 S - Y  
 1 2 9 M - S 1 3 5 L - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L  
 - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - D 2 8 3 S - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P  
 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N  
 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P -  
 T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; A  
 2 S - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 7  
 4 E - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - N 1 5 0 T - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - N 2 1  
 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1  
 Q ; M 1 L - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D  
 - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - A 1 3 6 L - P 1 6 8 A - Q 1 8 4 L -  
 N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8  
 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I  
 - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4  
 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S  
 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5  
 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q  
 ; T 3 R - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D -  
 N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 L - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - D 1 3 9 M - P 1 6 8 S - Q  
 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 .  
 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 D - N 6 7 D - A  
 6 8 S - N 7 1 D - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8  
 4 D - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 E - Z  
 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L  
 - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9  
 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7  
 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8  
 E - N 6 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9  
 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8  
 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S -  
 Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; 又は P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L

10

20

30

40

50

- N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Rを含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

【0091】

更なる実施形態は、P 1 9 E - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Q 2 4 2 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; N 1 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - L 6 6 V - A 6 8 S - N 7 4 S - V 7 5 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - I 1 2 4 V - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 S - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - N 6 7 D - Q 7 8 H - K 8 0 T - I 8 2 M - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; G 4 S - N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - T 1 3 1 A - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K

10

20

30

40

50

2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T  
 - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T  
 - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8  
 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E -  
 S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M  
 - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 1 4 I - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5  
 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5  
 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S  
 - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6  
 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 V - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - T 6 2 E - N 6 7 D  
 - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - F 1 6 7 Y - P 1 6 8 S -  
 Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4  
 A - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; Y 6 E - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E -  
 K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - S 1 3 5 L - P 1  
 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D -  
 N 2 6 1 Q - D 2 8 3 S - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E  
 - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2  
 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K  
 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; A 2 S - P 1 9 E - G 2 8 S -  
 S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 7 4 E - K 9 3 R - N 9 7 D -  
 Y 1 2 9 M - N 1 5 0 T - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5  
 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; M 1 L - N 1 0 T - P 1  
 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9  
 7 D - Y 1 2 9 M - A 1 3 6 L - P 1 6 8 A - Q 1 8 4 L - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y  
 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8  
 E - S 5 9 V - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y -  
 Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1  
 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R  
 - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L  
 - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; 又は N 1 0 T - P 1 9 E -  
 G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 D - N 6 7 D - A 6 8 S - N 7 1 D - K 9 3 R -  
 N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 D - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L  
 - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - T 2 8 4 E - Z 2 9 8 . 0 1 Q を含むアミノ酸  
 配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；  
 変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4  
 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

## 【 0 0 9 2 】

更なる実施形態は、 P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4  
 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D -  
 Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Q 2 4 2 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8  
 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L -  
 G 2 2 5 C - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N  
 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D -  
 N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D  
 - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C -  
 T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N  
 1 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7  
 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2  
 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6  
 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - T

10

20

30

40

50

1 3 1 A - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D  
 - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V  
 - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1  
 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2  
 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; Y 6 E - N 1 0 T - P 1 9 E - G  
 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - E 1 1 1 S -  
 Y 1 2 9 M - S 1 3 5 L - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5  
 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - D 2 8 3 S - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T -  
 P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D -  
 N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P 10  
 - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ;  
 A 2 S - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N  
 7 4 E - K 9 3 R - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - N 1 5 0 T - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - N 2  
 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - Z 2 9 8 . 0  
 1 Q ; M 1 L - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7  
 D - N 7 1 D - Q 7 8 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - A 1 3 6 L - P 1 6 8 A - Q 1 8 4 L  
 - N 2 1 3 A - G 2 2 5 C - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9  
 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G  
 2 2 5 C - K 2 4 4 L ; P 1 9 E - K 6 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1  
 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N 7 1 20  
 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; K 6  
 3 L - N 7 1 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 R - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2  
 2 8 V - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - G 2 5 9 P ; 又は P 1 9 E - T 3 8 E - K 6 3 L - N  
 7 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R を  
 含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性  
 断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、  
 配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

## 【 0 0 9 3 】

更なる実施形態は、 P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - N 9 7 D - Q 1 8 4 L - A 2 1 7  
 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R ; P 1 30  
 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8  
 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2  
 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - T 3 8 E  
 - K 6 3 L - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L -  
 G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8  
 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D - K 8 0 T - N 9 7 D -  
 Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - Q 1 8 4 L - A 2 1 7 P - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5  
 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - S 3 0 T - T  
 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M  
 - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 40  
 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5  
 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S  
 - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6  
 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; G 4 S - N 1 0 T - P 1 9 E - T 3 8 E - N 6 7 D - Q 7 8 D  
 - K 8 0 T - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L  
 - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3  
 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 L - K 7 0 R - N 7 1 D - Q 7 8 D - K 8  
 0 T - N 9 7 D - E 1 1 1 D - Y 1 2 9 M - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2  
 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0  
 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 50

D - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; Y 6 E - N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 S - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 L - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - E 1 1 1 S - Y 1 2 9 M - S 1 3 5 L - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 Q - D 2 8 3 S - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; N 1 0 T - P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 7 1 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - K 1 4 3 Q - P 1 6 8 S - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 P - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; P 1 9 E - T 3 8 E - S 5 9 V - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q ; 又は N 1 0 T - P 1 9 E - G 2 8 A - S 3 0 T - T 3 8 E - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - Y 1 2 9 M - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し；変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

10

【 0 0 9 4 】

更なる実施形態は、 P 1 9 E - S 3 0 T - T 3 8 E - S 5 9 V - L 6 0 Q - K 6 3 R - N 6 7 D - N 9 7 D - V 1 0 3 I - Y 1 2 9 M - F 1 6 7 Y - Q 1 8 4 L - G 2 2 5 C - T 2 2 8 V - Y 2 3 5 L - K 2 4 4 L - S 2 5 8 D - N 2 6 1 R - Z 2 9 8 . 0 1 Q を含むアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。

20

【 0 0 9 5 】

更なる実施形態において、マンナナーゼ変異体又は組換えポリペプチドは、配列番号 1 3 及び配列番号 4 6 ~ 9 1 から選択される。更なる実施形態において、マンナナーゼ変異体又は組換えポリペプチドは、配列番号 1 3、4 9、6 0、6 9、7 4、7 7、7 8、8 2、及び 8 3 から選択される。

【 0 0 9 6 】

別の実施形態は、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含むマンナナーゼの N D L - C l a d e に関し、前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに：位置 3 1 ~ 4 0 にて W X <sub>a</sub> K N D L X X A I (配列番号 1 5) のモチーフ (式中、X <sub>a</sub> は、F 又は Y であり、X は、あらゆるアミノ酸である) (「モチーフ 1」)；位置 2 6 3 ~ 2 7 4 にて L D X X X G P X G X L T (配列番号 1 6) のモチーフ (式中、X は、あらゆるアミノ酸である) (「欠失モチーフ 1」)；位置 2 6 3 ~ 2 7 4 にて L D X <sub>1</sub> V / A T / A G P X <sub>2</sub> G X <sub>3</sub> L T (配列番号 1 7) のモチーフ (式中、X <sub>1</sub> は、M 又は L であり、X <sub>2</sub> は、N、A、又は S であり、X <sub>3</sub> は、S、T、又は N である) (「欠失モチーフ 2」)；及び位置 2 6 3 ~ 2 7 4 にて L D M / L A T G P N / A G S / T L T (配列番号 1 8) のモチーフ (「欠失モチーフ 3」) から選択される 1 つ又は複数のモチーフを含み、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられている。更なる実施形態は、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含むマンナナーゼの N D L - C l a d e に関し、前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに：位置 3 1 ~ 4 0 にて W X <sub>a</sub> K N D L X X A I (配列番号 1 5) のモチーフ (式中、X <sub>a</sub> は、F 又は Y であり、X は、あらゆるアミノ酸である)；位置 2 6 3 ~ 2 7 4 にて L D X X X G P X G X L T (配列番号 1 6) のモチーフ (式中、X は、あらゆるアミノ酸である)；位置 2 6 3 ~ 2 7 4 にて L D X <sub>1</sub> V / A T / A G P X <sub>2</sub> G X <sub>3</sub> L T (配列番号 1 7) のモチーフ (式中、X <sub>1</sub> は、M 又は L であり、X <sub>2</sub> は、N、A、又は S であり、X <sub>3</sub> は、S、T、又は N である)；及び位置 2 6 3 ~ 2 7 4 にて L D M / L A T G

30

40

50

PN/AGS/TLT (配列番号18)のモチーフから選択される1つ又は複数のモチーフを含み、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられているが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU308431、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、PamMan2、PamMan3、PtuMan2、AAx87003、WP\_\_046227931、WP\_\_024633848、PpaMan2、WP\_\_017813111、PspMan9、AEX60762、WP\_\_046214462、YP\_\_003868989、YP\_\_003944884、WP\_\_017427981、AAx87002、WP\_\_009593769、YP\_\_006190599、そしてWP\_\_019912481でないことを条件とする。

10

## 【0097】

更なる実施形態は、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含むマンナナーゼのNDL-Cladeに関し、前記変異体、又は組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、位置31~40にてWX<sub>a</sub>KNDLXXAI (配列番号15)のモチーフを含み、X<sub>a</sub>は、Fであり、Xは、あらゆるアミノ酸であり、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられているが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU308431、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、AAx87003、そしてAEX60762でないことを条件とする。更なる実施形態は、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含むマンナナーゼのNDL-Cladeに関し、前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、位置31~40にてWX<sub>a</sub>KNDLXXAI (配列番号15)のモチーフを含み、X<sub>a</sub>は、Fであり、Xは、あらゆるアミノ酸であり、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられているが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU308431、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、AAx87003、AEX60762、PamMan2、PamMan3、PtuMan2、PpaMan2、そしてPspMan9でないことを条件とする。

20

30

## 【0098】

更なる実施形態において、マンナナーゼのNDL-Cladeは、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含み、前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、位置263~274にてLDX<sub>1</sub>V/AT/AGPX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>LT (配列番号17)又はLDM/LATGPN/AGS/TLT (配列番号18)のモチーフを含み、X<sub>1</sub>は、Mであり；X<sub>2</sub>は、N、A、又はSであり；X<sub>3</sub>は、S、T、又はNであり、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられているが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、そしてWP\_\_046214462でないことを条件とする。更なる実施形態において、マンナナーゼのNDL-Cladeは、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含み、前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、位置263~274にてLDX<sub>1</sub>V/AT/AGPX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>LT (配列番号17)又はLDM/LATGPN/AGS/TLT (配列番号18)のモチーフを含み、X<sub>1</sub>は、Mであり；X<sub>2</sub>は、N、A、又はSであり；X<sub>3</sub>は、S、T、又はNであり、変異体、又は

40

50



その組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられているが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_046214462、そしてPamMan2でないことを条件とする。更なる実施形態において、マンナーゼのNDL-Cladeは、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含み、前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、(i)位置31~40にてWX<sub>a</sub>KNDLXXAI(配列番号15)のモチーフ(式中、X<sub>a</sub>は、Fであり、Xは、あらゆるアミノ酸である)、及び(ii)位置263~274にてLDX<sub>1</sub>V/AT/AGPX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>LT(配列番号17)又はLDM/LATGPN/AGS/TLT(配列番号18)のモチーフ(式中、X<sub>1</sub>は、Mであり; X<sub>2</sub>は、N、A、又はSであり; X<sub>3</sub>は、S、T、又はNである)を含み、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられているが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、そしてWP\_\_017688745でないことを条件とする。更なる実施形態において、マンナーゼのNDL-Cladeは、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含み、前記変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、(i)位置31~40にてWX<sub>a</sub>KNDLXXAI(配列番号15)のモチーフ(式中、X<sub>a</sub>は、Fであり、Xは、あらゆるアミノ酸である)、及び(ii)位置263~274にて、LDX<sub>1</sub>V/AT/AGPX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>LT(配列番号17)又はLDM/LATGPN/AGS/TLT(配列番号18)のモチーフ(式中、X<sub>1</sub>は、Mであり; X<sub>2</sub>は、N、A、又はSであり; X<sub>3</sub>は、S、T、又はNである)を含み、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のアミノ酸位置は、配列番号14のアミノ酸配列との対応によって番号を付けられているが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、そしてPamMan2でないことを条件とする。

10

20

【0099】

30

別の実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも59%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%であるアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又は組換えポリペプチド若しくは活性断片に関する。更なる実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも80%又は85%であるアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、AAX87003、WP\_\_046227931、WP\_\_017813111、AEX60762、そしてWP\_\_046214462でないことを条件とする。更なる実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも80%又は85%であるアミノ酸配列を含むマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、AAX87003、WP\_\_046227931、WP\_\_017813111、AEX60762、WP\_\_046214462、PamMan2、PamMan3、PtuMan2、PpaMan2、そしてPspMan9でないことを条件とする。更なる実施形態は、

40

50

配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも80%又は85%であるアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、AAX87003、WP\_\_046227931、WP\_\_017813111、AEX60762、WP\_\_046214462、そしてEP2260105-0418でないことを条件とする。更なる実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも80%又は85%であるアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、AAX87003、WP\_\_046227931、WP\_\_017813111、AEX60762、WP\_\_046214462、EP2260105-0418、PamMan2、PamMan3、PtuMan2、PpaMan2、そしてPspMan9でないことを条件とする。更なる実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも88%であるアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又は組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、そしてAAX87003でないことを条件とする。別の実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも88%であるアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又は組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、AAX87003、PamMan2、PamMan3、PtuMan2、PpaMan2、そしてPspMan9でないことを条件とする。更なる実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも88%であるアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又は組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、AAX87003、そしてEP2260105-0418でないことを条件とする。更なる実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも88%であるアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又は組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、WP\_\_053782127、WP\_\_024633848、AAX87003、EP2260105-0418、PamMan2、PamMan3、PtuMan2、PpaMan2、そしてPspMan9でないことを条件とする。更なる実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも92%であるアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又は組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、そしてWP\_\_017688745でないことを条件とする。更なる実施形態は、配列番号13のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも92%であるアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又は組換えポリペプチド若しくは活性断片に関するが、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ACU30843、ETT37549、WP\_\_036608478、WP\_\_036670707、WP\_\_017688745、PamMan2、PamM

10

20

30

40

50

a n 3、そして P t u M a n 2 でないことを条件とする。別の実施形態は、配列番号 1 3 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 9 5 % であるアミノ酸配列を含むマンナナーゼ変異体、又は組換えポリペプチド若しくは活性断片に関する。

【 0 1 0 0 】

一実施形態において、基準ポリペプチドは、G H 5 マンナナーゼである。別の実施形態において、基準ポリペプチドは、配列番号 1 4、配列番号 3 0、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 4、配列番号 1 6 0、及び配列番号 1 6 2 から選択される。別の実施形態において、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体は、配列番号 1 4、配列番号 3 0、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配列番号 1 6 0、及び / 又は配列番号 1 6 2 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 5 9 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % である。

10

【 0 1 0 1 】

更なる実施形態において、配列番号 1 4 は、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体が由来する基準ポリペプチドである。別の実施形態において、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 5 9 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % である。更なる実施形態において、配列番号 3 0 は、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体が由来する基準ポリペプチドである。別の実施形態において、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体は、配列番号 3 0 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 5 9 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % である。更なる実施形態において、配列番号 4 3 は、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体が由来する基準ポリペプチドである。別の実施形態において、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体は、配列番号 4 3 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 5 9 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % である。更なる実施形態において、配列番号 4 4 は、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体が由来する基準ポリペプチドである。さらに別の実施形態において、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体は、配列番号 4 4 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 5 9 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % である。さらに別の実施形態において、配列番号 4 5 は、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体が由来する基準ポリペプチドである。別の実施形態において、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体は、配列番号 4 5 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 5 9 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % である。さらに別の実施形態において、配列番号 1 6 0 又は 1 6 2 は、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体が由来する基準ポリペプチドである。更なる実施形態において、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナナーゼ変異体は、配列番号 1 6 0 又は 1 6 2 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 5 9 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4

20

30

40

50

%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。更なる実施形態において、マンナーゼ変異体は、GH5マンナーゼである。

【0102】

一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、単離されている。他の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体は、エンド-マンナーゼである。更なる実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、マンナーゼ活性を有する。さらに他の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、界面活性剤の存在下でマンナーゼ活性を有する。一部の実施形態において、マンナーゼ活性は、マンナンガム、ローカストビーンガムガラクトマンナン、及び/又はコンニャクグルコマンナンに対する活性である。更なる実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、洗剤組成物中で洗浄活性を有する。さらに他の実施形態は、プロテアーゼの存在下でマンナーゼ活性を有するマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関する。更なる実施形態は、グアーガム、ローカストビーンガム、及びそれらの組合せからなる群から選択される基質を加水分解するマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関する。一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、炭水化物結合モジュールを含まない。

10

20

【0103】

一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、広い範囲のpH条件にわたって酵素活性を有する。特定の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約4.0~約11.0のpHで酵素活性を有する。更なる実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約4.0~約11.0、約4.5~約9.0、約5.5~約8.5、又は約6.0~約7.5のpHにて、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%のマンナーゼ活性を有する。

【0104】

更なる実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約20~約90、約30~約80、約20~約50、又は約30~約66に及ぶ温度にて、マンナーゼ活性を有する。特定の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約20~約90、約30~約80、約20~約50、又は約30~約66の温度範囲にて、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%のマンナーゼ活性を有する。

30

【0105】

更なる実施形態は、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、4.5~9.0、5.5~8.5、又は6.0~7.5のpH範囲にて、その最大マンナーゼ活性を少なくとも70%保持する。一部の実施形態は、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に関し、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、3.0、3.5、4.0、若しくは4.5を超えるpHにて、又は9.0、9.5、若しくは10.0未満のpHにて、その最大マンナーゼ活性を少なくとも70%保持する。

40

【0106】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、基準ポリペプチドと比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の向上は、プロテアーゼの存在下での安定性の向上、洗剤又はバッファ中での安定性の向上、洗浄性能の向上、及び年数を経た洗浄性能の向

50

上から選択される。別の実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、基準ポリペプチドと比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の向上は、プロテアーゼの存在下での安定性の向上、洗剤又はバッファ中での安定性の向上、洗浄性能の向上、及び年数を経た洗浄性能の向上から選択され、基準ポリペプチドは、配列番号14、43、44、45、及び160から選択される。さらに別の実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、配列番号14と比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の向上は、プロテアーゼの存在下での安定性の向上、洗剤又はバッファ中での安定性の向上、洗浄性能の向上、及び年数を経た洗浄性能の向上から選択される。さらに別の実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、配列番号43と比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の向上は、プロテアーゼの存在下での安定性の向上、洗剤又はバッファ中での安定性の向上、洗浄性能の向上、及び年数を経た洗浄性能の向上から選択される。更なる実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、配列番号44と比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の向上は、プロテアーゼの存在下での安定性の向上、洗剤又はバッファ中での安定性の向上、洗浄性能の向上、及び年数を経た洗浄性能の向上から選択される。更なる実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、配列番号45と比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の向上は、プロテアーゼの存在下での安定性の向上、洗剤又はバッファ中での安定性の向上、洗浄性能の向上、及び年数を経た洗浄性能の向上から選択される。別の実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、配列番号160と比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の向上は、プロテアーゼの存在下での安定性の向上、洗剤又はバッファ中での安定性の向上、洗浄性能の向上、及び年数を経た洗浄性能の向上から選択される。

10

20

【0107】

更なる実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、基準ポリペプチドと比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の前記向上は、(i)洗剤中での安定性の向上であって、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約40～約70、約45～約65、約50～約60、約60～約70、又は約56の温度にて、少なくとも5分間、少なくとも10%、20%、30%、40%、又は50%の残留マンナナーゼ活性を保持する、向上；(ii)プロテアーゼの存在下での安定性の向上であって、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、プロテアーゼ及び/又は界面活性剤の存在下で、少なくとも15日間、又は約15～約40日間、マンナナーゼ活性を少なくとも50%保持する、向上；(iii)洗浄性能の向上であって、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ローカストビーンガムの染みの洗浄性能指数(「PI」)が>1である、向上；並びにiv)年数を経た洗浄性能の向上であって、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、7時間後に洗浄活性が少なくとも15%残留しており、又は9時間後に洗浄活性が少なくとも1%残留している、向上から選択される。更なる実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、基準ポリペプチドと比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の前記向上は、洗剤中での安定性の向上であり、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約40～約70、約45～約65、約50～約60、約60～約70、又は約56の温度にて、少なくとも5分間、少なくとも10%、20%、30%、40%、又は50%の残留マンナナーゼ活性を保持する。更なる実施形態において、本明細書中に記

30

40

50

載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、基準ポリペプチドと比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の前記向上は、プロテアーゼの存在下での安定性の向上であり、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、プロテアーゼ及び/又は界面活性剤の存在下で、少なくとも15日間、又は約15～約40日間、マンナナーゼ活性を少なくとも50%保持する。更なる実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、基準ポリペプチドと比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の前記向上は、洗浄性能の向上であり、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ローカストビーンガムの染みの洗浄PIが>1である。更なる実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、基準ポリペプチドと比較して、1つ又は複数の特性が向上しており、特性の前記向上は、年数を経た洗浄性能の向上であり、前記マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、7時間後に洗浄活性が少なくとも15%残留しており、又は9時間後に洗浄活性が少なくとも11%残留している。

10

## 【0108】

一部の実施形態において、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約40～70℃、約45～65℃、約50～60℃、約60～70℃、又は約60℃の温度にて、少なくとも10%、20%、30%、40%、又は50%の残留マンナナーゼ活性を保持する。更なる実施形態において、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、約40～70℃、約45～75℃、約45～65℃、約50～60℃、又は約60～70℃の温度範囲にて、その最大マンナナーゼ活性を少なくとも70%保持する。他の実施形態において、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、20℃、25℃、30℃、35℃、若しくは40℃を超える温度にて、又は60℃、65℃、70℃、75℃、若しくは80℃未満の温度にて、その最大マンナナーゼ活性を少なくとも70%保持する。更なる実施形態において、保持される最大マンナナーゼ活性の量は、5分間にわたって判定される。

20

## 【0109】

他の特定の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ポリペプチドの構造及び/又は機能に実質的に影響を及ぼさない置換を含む。例示的な置換は、表Iに要約されるような保存的突然変異である。

30

## 【0110】

40

50

【表 1】

表 I. アミノ酸置換

元の残基	コード	許容可能な置換
アラニン	A	D-Ala, Gly, ベータ-Ala, L-Cys, D-Cys
アルギニン	R	D-Arg, Lys, D-Lys, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
アスパラギン	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
アスパラギン酸	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
グルタミン	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, ベータ-Ala, Acp
イソロイシン	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
リジン	K	D-Lys, Arg, D-Arg, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
メチオニン	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-ドーパ, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, 又は 5-フェニルプロリン, cis-3,4, 又は 5-フェニルプロリン
プロリン	P	D-Pro, L-1-チアゾリジン-4-カルボン酸, D-又は L-1-オキサゾリジン-4-カルボン酸
セリン	S	D-Ser, Thr, D-Thr, アロ-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
トレオニン	T	D-Thr, Ser, D-Ser, アロ-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
チロシン	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-ドーパ, His, D-His
バリン	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

10

20

## 【0111】

天然に存在するアミノ酸に関わる置換は、一般に、本明細書中に記載される組換えポリペプチドをコードする核酸を突然変異させることによってもたらされる。天然に存在しないアミノ酸に関わる置換又はアミノ酸への化学改変は、一般に、本明細書中に記載される組換えポリペプチドを化学的に改変することによってもたらされる。

30

## 【0112】

一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、配列番号 13 と実質的に同一であり、これは、変異体、又はそのポリペプチド若しくは活性断片の構造、機能、又は発現に大きな影響を及ぼさないアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を含有し得ることを意味する。そのようなマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片として、本記載を回避するようにのみ設計されたものが挙げられる。

40

## 【0113】

一部の実施形態において、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、1, 4 - - D - マンノシドヒドロラーゼ活性を有し、これとして、マンナーゼ、エンド - 1, 4 - - D - マンナーゼ、エキソ - 1, 4 - - D - マンナーゼガラクトマンナーゼ、及び / 又はグルコマンナーゼの活性が挙げられる。1, 4 - - D - マンノシドヒドロラーゼ活性は、本明細書中に記載されるアッセイを用いて、又は当該技術分野において知られている他のアッセイによって、判定且つ測定され得る。一部の実施形態において、本発明のポリペプチドは、洗剤組成物の存在下で、活性を有する。

## 【0114】

一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換

50

えポリペプチド若しくは活性断片は、例えば、抽出、検出、及び/又は精製を補助し、且つ/あるいは機能的特性を変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に付加するための、N末端融合タンパク質及び/又はC末端融合タンパク質として産生される。融合タンパク質パートナーの例として、以下に限定されないが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、6XHis、GAL4(DNA結合ドメイン及び/又は転写活性化ドメイン)、FLAG、MYC、BCE103(国際公開第2010/044786号パンフレット)、又は当業者に周知の他のタグが挙げられる。一部の実施形態において、タンパク質分解切断部位は、融合タンパク質パートナーと注目するタンパク質配列との間に提供されて、融合タンパク質配列の除去が可能となる。好ましくは、融合タンパク質は、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の活性を妨害しない。

10

## 【0115】

一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、リーダーペプチド、プロペプチド、1つ若しくは複数の結合ドメイン(モジュール)、及び/又は触媒ドメインが挙げられる機能ドメインに融合される。適切な結合ドメインとして、以下に限定されないが、種々の特異性の炭水化物結合モジュール(CBM)が挙げられ、これは、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の使用中に存在する炭水化物成分への親和性の増大を付与する。本明細書中に記載されるように、CBMと、本発明のポリペプチドの触媒ドメインとは、作動可能に結合される。

20

## 【0116】

CBMは、炭水化物結合活性を有する折畳みが控え目な(discreet)、炭水化物活性酵素内の連続アミノ酸配列と定義される。少数の例外として、タンパク質中のセルロソームスカフォールド内のCBM、及び独立した推定のCBMの稀な例がある。より大きな酵素内にモジュールとして存在するCBMの要件は、炭水化物結合タンパク質のこのクラスを、レクチン及び糖輸送タンパク質等の他の非触媒糖結合タンパク質から区別する。CBMは以前に、セルロースに結合するいくつかのモジュールの初期の発見に基づいて、セルロース結合ドメイン(CBD)と分類された(Tomme et al., Eur J Biochem, 170: 575-581, 1988; 及び Gilkes et al., J Biol Chem, 263: 10401-10407, 1988)。しかしながら、セルロース以外の炭水化物に結合するが、それを別にすればCBM基準を満たす、炭水化物活性酵素中の追加的なモジュールが引き続いて発見されている。それゆえに、より包括的な専門用語を用いてこれらのポリペプチドを分類し直す必要がある。セルロース結合ドメインの以前の分類は、アミノ酸類似性に基づいていた。CBDのグループ化が、「型」と呼ばれており、ローマ数字の番号が付けられる(例えばI型CBD又はII型CBD)。グリコシドヒドロラーゼ分類に合わせて、当該グループ化は現在、ファミリーと呼ばれており、アラビア数字の番号が付けられる。ファミリー1~13は、I型からXII型と同じである(Tomme et al. (Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides (Saddler, J. N. & Penner, M., eds.), Cellulose-binding domains: classification and properties. pp. 142-163, American Chemical Society, Washington, 1995))。CBMの構造及び結合モードについての詳細なレビューが、Boraston et al., Biochem J, 382: 769-81, 2004に見出され得る。CBMのファミリー分類は、CBMの同定を補助し、結合特異性を予測し、機能残基の同定を補助し、進化関係を明らかにし、且つポリペプチドの折畳みをおそらく予測できると予想される。タンパク質の折畳みは、その配列よりもよく保存されているので、CBMファミリーの一部は、スーパーファミリー又はクランにグループ化され得る。現在のCBMファミリーは、1~63である。CBDは、タンパク質のN末端及びC末端に見出され、又は内部にある。酵素ハイブリッドが、当該技術分野において知られており(

30

40

50



例えば、国際公開第90/00609号パンフレット及び国際公開第95/16782号パンフレット参照)、これは、本明細書において記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするDNA配列に、リンカーと共に、又はリンカー無しで、ライゲーションされたセルロース結合ドメインをコードするDNAの少なくとも断片を含むDNA構築物を宿主細胞に形質転換して、当該宿主細胞を増殖させて融合遺伝子を発現させることによって、調製され得る。

【0117】

酵素ハイブリッドは、以下の式によって記載され得：CBM-MR-X又はX-MR-CBM、式中、CBMは、少なくとも炭水化物結合モジュールに対応するアミノ酸配列のN末端領域又はC末端領域であり；MRは、中間の領域（リンカー）であり、且つ約2～約100個の炭素原子、約2～約40の炭素原子、約2～約100個のアミノ酸、又は約2～約40個のアミノ酸の結合基であっても短い結合基であってもよく；そしてXは、マンナーゼ触媒活性を有する、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片のN末端領域又はC末端領域である。加えて、マンナーゼは、非解糖機能の複数のCBM又は他のモジュール/ドメインを含有してよい。用語「モジュール」及び「ドメイン」は、本開示において互換的に用いられる。

10

【0118】

触媒ドメインの非限定的な更なる例として、以下が挙げられる：セルラーゼ；ヘミセルラーゼ、例えばキシラナーゼ；エキソ-マンナーゼ；グルカナーゼ；アラビナーゼ；ガラクトシダーゼ；ペクチナーゼ；並びに/又は他の活性物質、例えばプロテアーゼ、リパーゼ、酸ホスファターゼ、及び/若しくはその他、あるいはそれらの機能断片。融合タンパク質は、場合によっては、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片と融合ドメインとを、いずれの成分の特性にも大きな影響を及ぼすことなく単純に結合するリンカー配列により結合され、あるいはリンカーは、場合によっては、意図される用途にとっての機能的な重要性を有する。

20

【0119】

これ以外にも、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、注目する1つ又は複数の追加的なタンパク質と併用される。注目するタンパク質の非限定な例として、以下が挙げられる：アシルトランスフェラーゼ、アミラーゼ、アルファ-アミラーゼ、ベータ-アミラーゼ、アルファ-ガラクトシダーゼ、アラビナーゼ、アラビノシダーゼ、アリアルエステラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルカナーゼ、カラギナーゼ、カタラーゼ、セロビオヒドラーゼ、セルラーゼ、コンドロイチナーゼ、クチナーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、エンド-ベータ-マンナーゼ、エキソ-ベータ-マンナーゼ、エステラーゼ、エキソ-マンナーゼ、ガラクタナーゼ、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、ケラチナーゼ、ラッカーゼ、ラクターゼ、リグニナーゼ、リパーゼ、脂肪分解酵素、リボキシゲナーゼ、マンナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチナーゼ、ペントサナーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、ブルナーゼ、リダクターゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、タンナーゼ、トランスグルタミナーゼ、キシランアセチルエステラーゼ、キシラナーゼ、キシログルカナーゼ、キシロシダーゼ、メタロプロテアーゼ、及び/又は他の酵素。

30

40

【0120】

他の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、変異体、又はそのポリペプチド若しくは活性断片の細胞外分泌を導くシグナルペプチドに融合される。例えば、特定の実施形態において、シグナルペプチドは、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の固有のシグナルペプチドである。他の実施形態において、シグナルペプチドは、外来のシグナルペプチド、例えば枯草菌(B. subtilis) Apr

50

Eシグナルペプチドである。

【0121】

一部の実施形態において、本発明のポリペプチドは、異種生物、すなわちバチルス (*Paenibacillus*) 属種以外の生物中で発現される。例示的な異種生物として、グラム (+) 細菌、例えば枯草菌 (*B. subtilis*)、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. レンタス* (*B. lentus*)、*B. ブレビス* (*B. brevis*)、*ゲオバチルス* (*Geobacillus*) (以前はバチルス (*Bacillus*))・*ステアロサーモフィラス* (*stearothermophilus*)、*B. アルカロフィラス* (*B. alkalophilus*)、*B. アミロリケファシエンス* (*B. amyloliquefaciens*)、*B. コアギュランス* (*B. coagulans*)、*B. サーキュランス* (*B. circulans*)、*B. ロータス* (*B. lautus*)、*B. メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B. チューリングンシス* (*B. thuringiensis*)、*S. リビダンス* (*S. lividans*)、又は *S. ミュリナス* (*S. murinus*)；グラム (-) 細菌、例えば大腸菌 (*E. coli*)；酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属種又はシゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属種、例えば出芽酵母 (*S. cerevisiae*)；並びに糸状菌類、例えばアスペルギルス (*Aspergillus*) 属種、例えばニホンコウジカビ (*A. oryzae*) 又はクロコウジカビ (*A. niger*)、及び *T. リーゼイ* (*T. reesei*) がいる。核酸をこれらの生物に形質転換する方法は、当該技術分野において周知である。アスペルギルス (*Aspergillus*) 属宿主細胞の形質転換に適した手順が、EP 238023 号明細書に記載されている。

10

20

【0122】

特定の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、異種生物中で分泌ポリペプチドとして発現され、この場合、組成物及び方法は、異種生物中に分泌されたポリペプチドとしての変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を発現する方法を包含する。

【0123】

更なる実施形態は、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を生産する方法であって：マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで宿主細胞を安定して形質転換することと；形質転換された宿主細胞を、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を産生するのに適した条件下で培養することと；マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を回収することを含む方法に関する。

30

【0124】

さらに別の実施形態は、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするポリヌクレオチドに関する。一態様において、ポリヌクレオチドは、異種生物、例えば本明細書中で同定される生物中に含有される発現ベクター内に含有される。ポリヌクレオチドは、本明細書中に記載されるコードされた変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の発現を補助する調節要素 (例えば、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー等) に作動可能に結合されていてよい。一実施形態は、配列番号 1 及び配列番号 93 ~ 139 から選択されるヌクレオチド配列を有する変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするポリヌクレオチド配列に関する。別の実施形態は、配列番号 1、96、107、114、117、122、125、126、130、及び 131 から選択されるヌクレオチド配列を有する変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするポリヌクレオチド配列に関する。

40

【0125】

一部の実施形態は、配列番号 13 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なく

50

とも59%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%である変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするポリヌクレオチドに関する。更なる実施形態は、配列番号1に対する同一性が少なくとも59%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%であるポリヌクレオチドに関する。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、異なる宿主中での発現のためにコドン最適化され、クローニング部位を導入するように突然変異され、又はそれ以外では官能性を付加するように変更されている。

10

## 【0126】

一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするポリヌクレオチドは、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の細胞外分泌を導くシグナルペプチドのコーディング配列の下流に融合される。発現ベクターは、本明細書中に記載される変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を発現するのに適した、あるいは適切な宿主細胞中に導入する前に発現ベクターを増殖させるのに適した異種宿主細胞内に提供されてよい。

## 【0127】

一部の実施形態において、変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするポリヌクレオチドは、指定されたハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1のポリヌクレオチド又はその相補体にハイブリダイズする。例示的な条件は、本明細書中に記載されるストリンジエントな条件及び高度にストリンジエントな条件である。

20

## 【0128】

本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするDNAは、公開されている配列から化学的に合成され得、又は遺伝子を有する宿主細胞から直接（例えば、cDNAライブラリース洗浄又はPCR増幅によって）得られ得る。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、発現カセット内に含まれ、且つ/又は標準的な分子クローニング技術によって適切な発現ベクター中にクローニングされる。そのような発現カセット又はベクターは、転写の開始、そして終結を補助する配列（例えば、プロモーター及びターミネーター）を含有し、且つ選択可能なマーカーを一般に含有する。

30

## 【0129】

発現カセット又はベクターは、適切な発現宿主細胞中に導入されて、これが次に、本明細書中に記載される、対応するマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を発現する。特に適した発現宿主は、細菌属の発現宿主であり、エシェリキア (*Escherichia*) 属（例えば大腸菌 (*E. coli*)）、シュドモナス (*Pseudomonas*) 属（例えば、*P. fluorescens*）又は *P. stutzeri*）、プロテウス (*Proteus*) 属（例えば *P. mirabilis*）、ラルストニア (*Ralstonia*) 属（例えば *R. eutropha*）、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属（例えば *S. carnosus*）、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属（例えば *L. lactis*）、又はバチルス (*Bacillus*) 属（枯草菌 (*subtilis*)、巨大菌 (*megaterium*)、リケニフォルミス (*licheniformis*) その他）が挙げられる。また、特に適しているのは、酵母発現宿主、例えば出芽酵母 (*S. cerevisiae*)、分裂酵母 (*S. pombe*)、*Y. lipolytica*）、*H. polymorpha*）、*K. lactis*）、又は *P. pastoris*）である。とりわけ適しているのは、真菌発現宿主、例えば、*C. lucknowense*）、*Aspergillus*

40

50

us) 属 (例えば、ニホンコウジカビ (*A. oryzae*)、クロコウジカビ (*A. niger*)、*A. nidulans* (A. ニデュランス (*A. nidulans*) その他) 又は *T. reesei* (*T. reesei*) である。また、適しているのは、哺乳類発現宿主、例えば、マウス (例えば NS0)、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)、又はベビーハムスター腎臓 (BHK) の細胞株である。他の真核生物宿主、例えば、昆虫細胞又はウイルス発現システム (例えば、バクテリオファージ、例えば、M13、T7ファージ若しくはラムダ、又はウイルス、例えばバキュロウイルス) もまた、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を生産するのに適している。

#### 【0130】

注目する特定の宿主中で分泌されるタンパク質と関連するプロモーター及び/又はシグナル配列は、当該宿主における、又は他の宿主におけるマンナナーゼの異種生産及び異種分泌に用いられる候補である。一例として、糸状菌系において、セロピオヒドラーゼ I (*cbh1*)、グルコアミラーゼ A (*glA*)、TAKA-アミラーゼ (*amyA*)、キシラーゼ (*exlA*)、*gpd*-プロモーター *cbh1*、*cbh11*、エンドグルカナナーゼ遺伝子 *EGI-EGV*、*Cel61B*、*Cel74A*、*egl1-egl5*、*gpd* プロモーター、*Pgk1*、*pki1*、*EF-1alpha*、*tef1*、*cDNA1*、及び *hex1* の遺伝子を駆動するプロモーターが特に適しており、いくつかの異なる生物 (例えば、クロコウジカビ (*A. niger*)、*T. reesei* (*T. reesei*)、ニホンコウジカビ (*A. oryzae*)、*A. awamori* (*A. awamori*)、及び *A. nidulans* (*A. nidulans*)) に由来し得る。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を、細胞外 (又はペリプラズム) 空間中に分泌する適切な相同シグナル配列又は非相同シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを組換えにより伴うことによって、細胞上澄み (又はペリプラズム空間又は溶解液) における酵素活性の直接の検出を可能にする。当該技術分野において知られている大腸菌 (*E. coli*)、他のグラム陰性菌、及び他の生物に特に適したシグナル配列として、*HlyA*、*DsbA*、*Pbp*、*PhoA*、*PelB*、*OmpA*、*OmpT*、又は M13ファージ *Gil1* 遺伝子の発現を駆動するものが挙げられる。当該技術分野において知られている枯草菌 (*B. subtilis*)、グラム陽性生物、及び他の生物に特に適したシグナル配列としてさらに、*AprE*、*NprB*、*Mpr*、*AmyA*、*AmyE*、*Blac*、*SacB* の発現を駆動するものが、そして出芽酵母 (*S. cerevisiae*) 又は他の酵母について、キラ毒素、*Bar1*、*Suc2*、接合因子アルファ、*Inu1A*、又は *Ggp1p* シグナル配列が挙げられる。シグナル配列は、いくつかのシグナルペプチダーゼによって切断されることで、残りの発現されたタンパク質から除去され得る。一部の実施形態において、残りのポリペプチドは、単独で、又は、N末端若しくはC末端に位置決めされる他のペプチド、タグ、若しくはタンパク質 (例えば、*6XHis*、*HA*、又は *FLAG* タグ) との融合体として、発現される。適切な融合体として、親和性精製又は検出を促進するタグ、ペプチド、又はタンパク質 (例えば、*BCE103*、*6XHis*、*HA*、キチン結合タンパク質、チオレドキシン、又は *FLAG* タグ)、及び標的マンナナーゼの発現、分泌、又はプロセッシングを促進するものが挙げられる。適切なプロセッシング部位として、インビボ又はインビトロでの切断のための、エンテロキナーゼ、*STE13*、*Kex2*、又は他のプロテアーゼ切断部位が挙げられる。

#### 【0131】

本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、いくつかの形質転換方法によって発現宿主細胞中に導入され得、当該方法として、以下に限定されないが、電気穿孔法、脂質支援形質転換又は形質移入 (「リポフェクション」)、化学的に媒介される形質移入 (例えば、*CaCl* 及び/又は *CaP*)、酢酸リチウム媒介形質転換 (例えば、宿主細胞プロトプラストの形質転換)、パイオリスティック「遺伝子ガン」形質転換、*PEG* 媒介形質転換 (例えば、宿主細胞プロトプラストの形質転換)、プロトプラスト融合 (例えば、細菌プロトプラスト又は真核生物プロトプラ

10

20

30

40

50

ストを用いる)、リポソーム媒介形質転換、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*)、アデノウイルス、又は他のウイルス若しくはファージの形質転換又は形質導入が挙げられる。

【0132】

これ以外にも、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、細胞内に発現され得る。場合によっては、酵素変異体の細胞内発現、又は上記されるようなシグナル配列を用いたペリプラズム空間中への分泌の後に、上澄み中にポリペプチドを放出する浸透化 (*permeabilisation*) 工程又は溶解工程が用いられてよい。膜バリアの崩壊が、機械的手段、例えば超音波、圧力処理 (フレンチプレス)、キャピテーションの使用、又は膜消化酵素、例えばリゾチーム若しくは酵素混合物の使用によってもたらされる。更なる代替法として、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片をコードするポリヌクレオチドは、適切な無細胞発現システムの使用によって発現され得る。無細胞システムにおいて、注目するポリヌクレオチドは典型的に、プロモーターにより転写されるが、環状の発現ベクターを形成するためのライゲーションは、任意選択である。他の実施形態において、無細胞システム内にRNAが、転写されることなく外生的に加えられて、又は生じて、翻訳される。

10

【0133】

別の実施形態は、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含む洗浄組成物、及びそのような組成物を洗浄用途に用いる方法に関する。洗浄用途として、以下に限定されないが、洗濯物又は織物の洗浄、洗濯物又は織物の柔軟仕上げ、食器洗い (手動及び自動)、及び染み前処理が挙げられる。特定の用途として、マンナン (例えば、ローカストビーンガム、グアーガムその他) が、除去されるべき汚れ又は染みの成分であるものがある。

20

【0134】

洗浄組成物は典型的に、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の有効量を含み、有効量は例えば、少なくとも0.0001重量パーセント、約0.0001~約1重量パーセント、約0.001~約0.5重量パーセント、約0.01~約0.1重量パーセント、約0.1~約1重量パーセント、又はそれ以上である。マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の有効量が洗浄組成物中に存在する結果、マンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、マンナン含有基質、例えばローカストビーンガム、グアーガム、又はそれらの組合せを加水分解するのに十分な酵素活性を有する。

30

【0135】

一部の実施形態は、粉末、液体、顆粒、バー、固体、半固体、ゲル、ペースト、エマルジョン、タブレット、カプセル、単位用量、シート、及び泡から選択される形態の洗浄組成物に関する。一部の実施形態において、洗浄組成物は、洗剤組成物である。他の実施形態において、洗浄組成物又は洗剤組成物は、洗濯洗剤、布地柔軟仕上げ洗剤、食器洗い洗剤、及び硬質表面洗浄洗剤から選択される。

【0136】

特段の記載がない限り、本明細書で提供される全ての成分又は組成物のレベルは、その成分又は組成物の活性レベルを基準に調整され、市販の供給源に存在し得る不純物、例えば、残存溶媒又は副産物を含まない。酵素成分の重量は、総活性タンパク質に基づいている。全てのパーセンテージ及び比率は、特段の記載がない限り、重量で計算される。全てのパーセンテージ及び比率は、特段の記載がない限り、総組成物に基づいて計算される。例示的な洗剤組成物では、酵素のレベルは、総組成物の重量によって純粋酵素で表され、そして特段の記載がない限り、洗剤成分は、総組成物の重量によって表される。

40

【0137】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、界面活性剤を含む。一部の実施形態において、界面活性剤は、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤

50

、半極性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、双性イオン性界面活性剤、並びにそれらの組合せ及び混合物から選択される。更なる実施形態において、界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、双性イオン性界面活性剤、及びそれらの組合せから選択される。一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物は、界面活性剤を、組成物の重量で約0.1%～約60%、約1%～約50%、又は約5%～約40%含む。例示的な界面活性剤として、以下に限定されないが、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、C12-14パレス-7、C12-15パレス-7、C12-15パレス硫酸ナトリウム、C14-15パレス-4、ラウレス硫酸ナトリウム(例えばSteol CS-370)、水添ヤシ脂肪酸ナトリウム、C12エトキシレート(Alfonic 1012-6、Hetoxol LA7、Hetoxol LA4)、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(例えばNacconol 90G)、並びにそれらの組合せ及び混合物が挙げられる。陰イオン性界面活性剤として、以下に限定されないが、直鎖アルキルベンゼンスルホネート(LAS)、アルファ-オレフィンスルホネート(AOS)、硫酸アルキル(脂肪アルコールサルフェート)(AS)、アルコールエトキシサルフェート(AEOS又はAES)、第二アルカンスルホネート(SAS)、アルファ-スルホ脂肪酸メチルエステル、アルキル若しくはアルケニルコハク酸、又は石鹼が挙げられる。非イオン性界面活性剤として、以下に限定されないが、アルコールエトキシレート(AEO又はAE)、カルボキシル化アルコールエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレート、アルキルポリグルコシド、アルキルジメチルアミンオキシド、エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド、脂肪酸モノエタノールアミド、ポリヒドロキシア  
アルキル脂肪酸アミド(例えば、国際公開第92/06154号パンフレットに記載)、脂肪酸のポリオキシエチレンエステル、ポリオキシエチレンソルビタンエステル(例えばTWEEN)、ポリオキシエチレンアルコール、ポリオキシエチレンイソアルコール、ポリオキシエチレンエーテル(例えば、TRITON及びBRJ)、ポリオキシエチレンエステル、ポリオキシエチレン-p-tert-オクチルフェノール又はオクチルフェニル-エチレンオキシド縮合物(例えばNONIDET P40)、脂肪族アルコールとのエチレンオキシド縮合物(例えばLUBROL)、ポリオキシエチレンノニルフェノール、ポリアルキレングリコール(SYNPERONIC F108)、糖型界面活性剤(例えば、グルコピラノシド、チオグルコピラノシド)、並びにそれらの組合せ及び混合物が挙げられる。

#### 【0138】

更なる実施形態において、本明細書中で開示される洗剤組成物はさらに、以下に限定されないが、5～15%陰イオン性界面活性剤、<5%非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、ホスホネート、石鹼、酵素、香料、ブチルフェニルプロピオン酸メチル、ガラニオール、ゼオライト、ポリカルボキシレート、ヘキシルシナマル、リモネン、陽イオン性界面活性剤、シトロネロール、及びベンズイソチアゾリオンを含む界面活性剤混合物を含む。

#### 【0139】

本明細書中で記載される洗浄組成物は追加的に、1つ又は複数の洗剤ビルダー又はビルダー系、錯体形成剤、ポリマー、漂白系、安定化剤、泡ブースター、起泡抑制剤、腐食防止剤、汚れ懸濁化剤、再汚染防止剤、色素、殺菌剤、ヒドロトロップ、変色阻害剤、蛍光増白剤、布地コンディショナ、及び香料を含んでもよい。本明細書中に記載される洗浄組成物はまた、プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、ペクチン分解酵素、キシログルカナーゼ、又は追加的なカルボン酸エステルヒドロラーゼから選択される追加的な酵素を含んでもよい。

#### 【0140】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、ビルダーを、洗浄組成物の重量で約1%～、約3%～約60%、又は約5%～約40%含む。ビルダーとして、以下に限定されないが、ポリホスフェートのアルカリ金属、アンモニウム塩、及びアルカノールアンモニウム塩、ケイ酸アルカリ金属、炭酸アルカリ土類金属及び炭酸ア

10

20

30

40

50

ルカリ金属、アルミノシリケート、ポリカルボキシレート化合物、エーテルヒドロキシポリカルボキシレート、エチレン又はビニルメチルエーテルとの無水マレイン酸のコポリマー、1,3,5-トリヒドロキシベンゼン-2,4,6-トリスルホン酸及びカルボキシメチルオキシコハク酸、ポリ酢酸、例えばエチレンジアミン四酢酸及びニトリロ三酢酸の種々のアルカリ金属、アンモニウム塩、及び置換アンモニウム塩、並びにポリカルボキシレート、例えばメリト酸、コハク酸、クエン酸、オキシジコハク酸、ポリマレイン酸、ベンゼン1,3,5-トリカルボン酸、カルボキシメチルオキシコハク酸、及びそれらの可溶性の塩が挙げられる。

#### 【0141】

一部の実施形態において、ビルダーは、水溶性硬度イオン錯体（例えば、封鎖性ビルダー）、例えば、シトレート及びポリホスフェート（例えば、トリポリリン酸ナトリウム及びトリポリリン酸ナトリウム六水和物、トリポリリン酸カリウム、並びにトリポリリン酸ナトリウムとトリポリリン酸カリウムとの混合物）を形成する。当該技術分野において知られているものが挙げられるあらゆる適切なビルダーが、本明細書中に記載される組成物に用いられ得る（例えばEP2100949号明細書参照）。

10

#### 【0142】

本明細書中で示されるように、一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、補助剤成分を含み、補助剤成分として、以下に限定されないが、界面活性剤、ビルダー、漂白剤、漂白活性化剤、漂白触媒、他の酵素、酵素安定化系、キレート剤、蛍光増白剤、汚れ遊離ポリマー、色素転移剤、色素転移阻害剤、触媒物質、過酸化水素、過酸化水素のソース、予め形成された過酸、ポリマー分散剤、土汚れ除去剤、構造弾性化剤、分散剤、起泡抑制剤、色素、香料、着色剤、フィラー塩、ヒドロトロップ、光活性化剤、蛍光剤、布地コンディショナー、加水分解性界面活性剤、溶媒、腐食防止剤、抗酸化剤、抗収縮剤、しわ防止剤、殺菌剤、殺真菌剤、色ムラ防止剤（color speckle）、シルバーケア、抗変色剤及び/又は腐食防止剤、アルカリソース、可溶化剤、キャリア、加工助剤、色素、並びにpH制御剤が挙げられる（例えば、米国特許第6610642号明細書；米国特許第6605458号明細書；米国特許第5705464号明細書；米国特許第5710115号明細書；米国特許第5698504号明細書；米国特許第5695679号明細書；米国特許第5686014号明細書；及び米国特許第5646101号明細書参照）。一部の実施形態において、1つ又は複数の補助剤は、例えば、洗浄されることになる基質の処理用に洗浄性能を補助若しくは強化するために、又は香料、着色剤、色素等の場合と同様に洗浄組成物の美観を改変するために、組み込まれる。そのようなあらゆる補助剤成分は、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片とは別である。これらの追加的な成分の正確な性質、及びその組み込みレベルは、組成物の物理的形態、及び組成物が用いられることになる洗浄操作の性質によって決まることとなる。

20

30

#### 【0143】

1つ又は複数の補助剤成分が、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片と適合しない実施形態において、洗浄補助剤成分及びマンナナーゼを、2つの成分の組合せがふさわしくなるまで、分離させて（すなわち、互いと接触させずに）維持する適切な方法が使用されてよい。そのような分離方法として、当該技術分野において知られているあらゆる適切な方法（例えば、ジェルキャップ、カプセル化、タブレット、物理的分離その他）が挙げられる。適切な補助剤成分の具体的な選択は、洗浄されることになる表面、アイテム、又は布地、及び使用中（例えば、洗い用洗剤の使用）の洗浄条件について組成物の所望される形態を考慮することによって、容易になされる。

40

#### 【0144】

本明細書中に記載される洗浄組成物は、例えば、洗濯用途、硬い表面の洗浄、食器洗い用途、及び美容用途に有利に使用される。さらに、本発明のポリペプチドは、顆粒状組成物及び液体組成物に用いられ得る。

#### 【0145】

50

本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はまた、添加製品の洗浄にも用いられ得る。一部の実施形態では、添加剤は、洗浄プロセスへの添加のために適した剤形にパッケージングされる。一部の実施形態では、添加剤は、過酸素(peroxygen)の供給源が利用され、高い漂白効果が望まれる洗浄プロセスへの添加のために剤形にパッケージングされる。限定されるものではないが、ピル、タブレット、ジェルキャップ、又は他の単回用量単位、例えば、予備計量された粉末又は液体を含む、任意の適切な単回用量単位形態を本開示に使用することができる。一部の実施形態では、充填剤又は担体物質が、このような組成物の嵩を増すために含まれる。適切な充填剤又は担体物質としては、限定されるものではないが、硫酸塩、炭酸塩、及びケイ酸塩の様々な塩、並びにタルク及び粘土などが挙げられる。液体組成物に適した適切な充填剤又は担体物質としては、限定されるものではないが、水、又はポリオール及びジオールを含む低分子量の第1級アルコール及び第2級アルコールが挙げられる。このようなアルコールの例としては、限定されるものではないが、メタノール、エタノール、プロパノール、及びイソプロパノールが挙げられる。一部の実施形態では、組成物は、約5%～約90%のこのような材料を含む。酸性充填剤は、pHを下げるために使用することができる。あるいは、一部の実施形態では、洗浄添加剤は、1つ又は複数の補助剤成分を含む。

10

#### 【0146】

一実施形態において、洗浄組成物又は洗浄添加物は、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の有効量を、場合によっては他のマンナナーゼ及び/又は付加的な酵素と組み合わせ、含有する。特定の実施形態において、付加的な酵素として、以下に限定されないが、アシルトランスフェラーゼ、アミラーゼ、アルファ-アミラーゼ、ベータ-アミラーゼ、アルファ-ガラクトシダーゼ、アラビナーゼ、アラビノシダーゼ、アリアルエステラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルカナーゼ、カラギナーゼ、カタラーゼ、セロビオヒドラーゼ、セルラーゼ、コンドロイチナーゼ、クチナーゼ、エンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ、エンド-ベータ-マンナナーゼ、エキソ-ベータ-マンナナーゼ、エステラーゼ、エキソ-マンナナーゼ、ガラクタナーゼ、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、ケラチナーゼ、ラッカーゼ、ラクターゼ、リグニナーゼ、リパーゼ、脂肪分解酵素、リポキシゲナーゼ、マンナナーゼ、メタロプロテアーゼ、オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチナーゼ、ペントサナーゼ、ペルヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、リダクターゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ベータ-グルカナーゼ、タンナーゼ、トランスグルタミナーゼ、キシランアセチルエステラーゼ、キシラナーゼ、キシログルカナーゼ、キシロシダーゼ、及びそれらの組合せから選択される少なくとも1つの酵素が挙げられる。更なる実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物又は洗浄添加物はさらに、プロテアーゼ及び/又はアミラーゼを含む。

20

30

#### 【0147】

本明細書の洗浄組成物は、典型的には、水性洗浄作業で使用中に、洗いのpHが約3.0～約11となるように調合される。液体製品調合物は、典型的には、約3.0～約9.0の正味のpHを有するように調合される。顆粒状洗濯用製品は、典型的には、約8.0～約11.0のpHを有するように調合される。一部の実施形態では、中性pH条件は、洗浄組成物が20の脱イオン水で1:100(wt:wt)に溶解されたときに、従来のpH計を用いて測定することができる。pHを推奨される使用レベルに調整する技術は、緩衝液、アルカリ、酸などの使用を含み、当業者に周知である。

40

#### 【0148】

適切な低いpHの洗浄組成物は典型的に、正味のpHが約3.0～約5.0、又は約3.5～約4.5である。低pH洗浄組成物は典型的に、そのようなpH環境において加水分解する界面活性剤がない。そのような界面活性剤として、少なくとも1つのエチレンオ

50



キシド部分、又は約 1 ~ 約 16 モルのエチレンオキシドを含むアルキル硫酸ナトリウム界面活性剤が挙げられる。そのような洗浄組成物は典型的に、正味の pH が約 3.0 ~ 約 5.0 であるそのような洗浄組成物を提供するに十分な量の pH 調整剤、例えば水酸化ナトリウム、モノエタノールアミン、又は塩酸を含む。そのような組成物は典型的に、少なくとも 1 つの酸安定酵素を含む。一部の実施形態において、組成物は液体である一方、他の実施形態では固体である。そのような液体組成物の pH は典型的に、正味の pH として測定される。そのような固体組成物の pH は、溶媒が蒸留水である、組成物の 10% 固体溶液として測定される。これらの実施形態において、全ての pH 測定値は、特に明記されない限り、20 にて測定される。

【0149】

適切な高い pH の洗浄組成物は典型的に、正味の pH が約 9.0 ~ 約 11.0 であり、又は正味の pH が 9.5 ~ 10.5 である。そのような洗浄組成物は典型的に、正味の pH が約 9.0 ~ 約 11.0 であるそのような洗浄組成物を提供するに十分な量の pH 調整剤、例えば水酸化ナトリウム、モノエタノールアミン、又は塩酸を含む。そのような組成物は典型的に、少なくとも 1 つの塩基安定酵素を含む。一部の実施形態において、組成物は液体である一方、他の実施形態では固体である。そのような液体組成物の pH は典型的に、正味の pH として測定される。そのような固体組成物の pH は、溶媒が蒸留水である、前記組成物の 10% 固体溶液として測定される。これらの実施形態において、全ての pH 測定値は、特に明記されない限り、20 にて測定される。

【0150】

一部の実施形態において、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、保存の間に顆粒状組成物の他の成分から保護するために、カプセル化粒子の形態である。加えて、カプセル化は、洗浄プロセスの間の、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の有効性を制御する手段でもある。一部の実施形態において、カプセル化は、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片、及び/あるいは付加的な酵素の性能を高める。この点に関して、マンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、当該技術分野において知られているあらゆる適切なカプセル化材料で封入される。典型的には、カプセル化材料は、水溶性及び/又は水分散性である。一部の実施形態では、カプセル化材料は、0 以上のガラス転移温度 (T<sub>g</sub>) を有する。ガラス転移温度は、国際公開第 97/11151 号パンフレットにさらに詳細に記載されている。カプセル化材料は、典型的には、炭水化物、天然又は合成ガム、キチン、キトサン、セルロース及びセルロース誘導体、ケイ酸塩、リン酸塩、ホウ酸塩、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、パラフィンワックス、及びこれらの組み合わせから選択される。カプセル化材料が炭水化物である場合は、カプセル化材料は、典型的には、単糖、オリゴ糖、多糖、及びこれらの組み合わせから選択される。一部の典型的な実施形態では、カプセル化材料はデンプンである (例えば、EP 0922499 号明細書; 及び米国特許第 4,977,252 号明細書; 同第 5,354,559 号明細書、及び同第 5,935,826 号明細書を参照されたい)。一部の実施形態では、カプセル化材料は、プラスチック、例えば、熱可塑性樹脂、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル、及びこれらの混合物から形成されるマイクロスフェア; 限定されるものではないが、EXPANCEL (登録商標) (Stockviksverken, Sweden) によって供給されるマイクロスフェア、並びに PM6545、PM6550、PM7220、PM7228、EXTENDOSPHERES (登録商標)、LUXSIL (登録商標)、Q-CEL (登録商標)、及び SPHERICEL (登録商標) (PQ Corp., Valley Forge, PA) を含む、使用できる市販のマイクロスフェアである。

【0151】

用語「顆粒状組成物」は、不連続な固体の、巨視的粒子の集塊を指す。粉末は、小さな粒子サイズに起因する特別なクラスの顆粒状物質である。これにより、より凝集性となり、且つより容易に懸濁される。

10

20

30

40

50

## 【0152】

典型的な洗い液中の洗剤組成物の濃度は、世界中で、約800ppm未満の洗剤組成物（低洗剤濃度の地域）、例えば、日本での約667ppmから、約800ppm～約2000ppm（「中間洗剤濃度の地域」）、例えば、米国での約975ppm、ブラジルの約1500ppm、そして約2000ppm超（「高洗剤濃度の地域」）、例えば、欧州での約4500ppm～約5000ppm及び高泡立ちリン酸塩ビルダーの地域での約6000ppmまでである。

## 【0153】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗剤組成物は、約10～約60、約20～約60、約30～約60、約40～約60、約40～約55、又は10から60の全ての範囲内の温度にて利用されてよい。一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗剤組成物は、約10～約40、約20～約30、約15～約25、約15～約35、又は10から40の全ての範囲内の温度での「冷水洗い」に用いられる。

10

## 【0154】

更なる例として、異なる地域は、典型的には異なる水の硬度を有する。水の硬度は通常、1ガロン当たりの $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ の合計グレーン数を単位として記載される。硬度は、水中のカルシウム（ $Ca^{2+}$ ）及びマグネシウム（ $Mg^{2+}$ ）の量の尺度である。米国の殆どの水は硬水であるが、硬さの程度は様々である。中程度に硬い（60～120ppm）から硬い（121～181ppm）水は、60～181ppmの硬度の鉱物を有する（ppmからグレーン/米国ガロンへの換算では、ppm数を17.1で除した値がグレーン/ガロンに等しい）。

20

## 【0155】

## 【表2】

表 II. 水硬度レベル

水	グレーン/ガロン	ppm
軟	1.0 未満	17 未満
僅かに硬	1.0 から 3.5	17 から 60
適度に硬	3.5 から 7.0	60 から 120
硬	7.0 から 10.5	120 から 180
非常に硬	10.5 超	180 超

30

## 【0156】

欧州の水の硬度は、典型的には、1ガロン当たり約10.5（例えば、約10.5～約20.0）の合計 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ グレーン（例えば、1ガロン当たり約15の合計 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ グレーン）を超える。北米の水の硬度は、典型的には、日本の水の硬度よりも高いが、欧州の水の硬度よりも低い。例えば、北米の水の硬度は、約3～約10グレーン、約3～約8グレーン、又は約6グレーンであり得る。日本の水の硬度は、典型的には北米の水の硬度よりも低く、通常は約4未満、例えば、約3合計 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ グレーン/ガロンである。

40

## 【0157】

一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、洗い性能が、市販のマンナナーゼに匹敵する。一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、市販のマンナナーゼと比較して高い洗い性能を示す。一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、高い酸化安定性、高い熱安定性、種々の条件下での高い洗浄能力、及び/又は高いキレーター安定性を示す。加えて、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、洗剤を含まない洗浄

50

組成物に、ここでも単独で、又はビルダー及び安定化剤と組み合わせられて、用いられてよい。

【0158】

本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片に加えて、あらゆる他の適切なマンナーゼが、本明細書中に記載される組成物に単独で、あるいは本明細書中に記載される変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片と組み合わせられて、用いられてよい。適切なマンナーゼとして、以下に限定されないが、グリコシルヒドロラーゼのGH26ファミリーのマンナーゼ、グリコシルヒドロラーゼのGH5ファミリーのマンナーゼ、酸性マンナーゼ、中性マンナーゼ、及びアルカリ性マンナーゼが挙げられる。アルカリ性マンナーゼの例として、米国特許第6060299号明細書；米国特許第6566114号明細書；及び米国特許第6602842号明細書；並びに国際公開第9535362号パンフレット、国際公開第9964573号パンフレット、国際公開第9964619号パンフレット、及び国際公開第2015022428号パンフレットに記載されるものが挙げられる。加えて、適切なマンナーゼとして、以下に限定されないが、動物、植物、真菌、又は細菌起源のものが挙げられる。化学的に、又は遺伝的に改変された突然変異体が、本開示によって包含される。

【0159】

有用なマンナーゼの例として、バチルス (*Bacillus*) 属エンド - - マンナーゼ、例えば枯草菌 (*B. subtilis*) エンド - - マンナーゼ (例えば、米国特許第6060299号明細書及び国際公開第9964573号パンフレット参照)、バチルス (*Bacillus*) 属種 I633 エンド - - マンナーゼ (例えば、米国特許第6566114号明細書及び国際公開第9964619号パンフレット参照)、バチルス (*Bacillus*) 属種 AA112 エンド - - マンナーゼ (例えば、米国特許第6566114号明細書及び国際公開第9964619号パンフレット参照)、バチルス (*B.*) 属種 AA349 エンド - - マンナーゼ (例えば、米国特許第6566114号明細書及び国際公開第9964619号パンフレット参照)、*B. agaradhaerens* NCIMB 40482 エンド - - マンナーゼ (例えば、米国特許第6566114号明細書及び国際公開第9964619号パンフレット参照)、*B. halodurans* エンド - - マンナーゼ、*B. clausii* エンド - - マンナーゼ (例えば、米国特許第6566114号明細書及び国際公開第9964619号パンフレット参照)、*B. licheniformis* エンド - - マンナーゼ (例えば、米国特許第6566114号明細書及び国際公開第9964619A1号パンフレット参照)、フミコーラ (*Humicola*) 属エンド - - マンナーゼ、例えば *H. insolens* エンド - - マンナーゼ (例えば、米国特許第6566114号明細書及び国際公開第9964619号パンフレット参照)、及びカルドセルロシルプトル (*Caldocellulosiruptor*) 属エンド - - マンナーゼ、例えばカルドセルロシルプトル属種エンド - - マンナーゼ (例えば、米国特許第6566114号明細書及び国際公開第9964619号パンフレット参照) が挙げられる。

【0160】

さらに、いくつかの同定されているマンナーゼ (すなわち、エンド - - マンナーゼ及びエキソ - - マンナーゼ) が、本開示の一部の実施形態に用いられ、これらとして、以下に限定されないが、マッシュルーム (*A. bisporus*) マンナーゼ (Tang et al., [2001] Appl. Environ. Microbiol. 67: 2298 - 2303 参照)、*A. tamaraii* マンナーゼ (Civas et al., [1984] Biochem. J. 219: 857 - 863 参照)、*A. aculeatus* マンナーゼ (Christgau et al., [1994] Biochem. Mol. Biol. Int. 33: 917 - 925 参照)、*A. awamori* マンナーゼ (Setati et

10

20

30

40

50

al., [2001] *Protein Express Purif.* 21:105-114 参照)、*A. fumigatus* (マンナナーゼ (Puchart et al., [2004] *Biochimica et biophysica Acta* 1674:239-250 参照)、*A. niger* (マンナナーゼ (Ademark et al., [1998] *J. Biotechnol.* 63:199-210 参照)、*A. oryzae* (NRRLマンナナーゼ (Regalado et al., [2000] *J. Sci. Food Agric.* 80:1343-1350 参照)、*A. sulphureus* (マンナナーゼ (Chen et al., [2007] *J. Biotechnol.* 128(3):452-461 参照)、*A. terreus* (マンナナーゼ (Huang et al., [2007] *Wei Sheng Wu Xue Bao* 47(2):280-284 参照)、*Paenibacillus* 属種及び *Bacillus* 属種マンナナーゼ (米国特許第6376445号明細書参照)、*Bacillus* 属AM001マンナナーゼ (Akino et al., [1989] *Arch. Microbiol.* 152:10-15 参照)、*B. brevis* (マンナナーゼ (Araujo and Ward, [1990] *J. Appl. Bacteriol.* 68:253-261 参照)、*B. circulans* K-1マンナナーゼ (Yoshida et al., [1998] *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(3):514-520 参照)、*B. polymyxa* (マンナナーゼ (Araujo and Ward, [1990] *J. Appl. Bacteriol.* 68:253-261 参照)、*Bacillus* 属種 JAMB-750マンナナーゼ (Hatada et al., [2005] *Extremophiles* 9:497-500 参照)、*Bacillus* 属種 M50マンナナーゼ (Chen et al., [2000] *Wei Sheng Wu Xue Bao* 40:62-68 参照)、*Bacillus* 属種 N16-5マンナナーゼ (Yanhe et al., [2004] *Extremophiles* 8:447-454 参照)、*B. stearoothermophilus* (マンナナーゼ (Talbot and Sygusch, [1990] *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3505-3510 参照)、*B. subtilis* (マンナナーゼ (Mendoza et al., [1994] *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:51-54 参照)、*B. subtilis* B36マンナナーゼ (Li et al., [2006] *Z. Naturforsch (C)* 61:840-846)、*B. subtilis* BM9602マンナナーゼ (Cui et al., [1999] *Wei Sheng Wu Xue Bao* 39(1):60-63 参照)、*B. subtilis* SA-22マンナナーゼ (Sun et al., [2003] *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 19(3):327-330 参照)、*B. subtilis* 168マンナナーゼ (Helow and Khattab, [1996] *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 43:289-299 参照)、*B. ovatus* (マンナナーゼ (Gherardini et al., [1987] *J. Bacteriol.* 169:2038-2043 参照)、*B. ruminicola* (マンナナーゼ (Matsushita et al., [1991] *J. Bacteriol.* 173:6919-6926 参照)、*C. cellulovorans* (マンナナーゼ (Sunna et al., [2000] *Appl. Environ. Microbiol.* 66:664-670 参照)、*C. saccharolyticus* (マンナナーゼ (Morris et al., [1995] *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2262-2269 参照)、*C. saccharolyticum* (マンナナーゼ (Bicho et al., [1991] *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:337-34

3 参照)、*C. フィミ* (*C. fimi*) マンナーゼ (Stoll et al., [1999] Appl. Environ. Microbiol. 65 (6): 2598 - 2605 参照)、*C. ブチリカム/ベイジェリンキ* (*C. butyricum/beijerinckii*) マンナーゼ (Nakajima and Matsuura, [1997] Biosci. Biotechnol. Biochem. 61: 1739 - 1742 参照)、*C. セルロリティカム* (*C. cellulolyticum*) マンナーゼ (Perret et al., [2004] Biotechnol. Appl. Biochem. 40: 255 - 259 参照)、*C. テルティウム* (*C. tertium*) マンナーゼ (Kataoka and Tokiwa, [1998] J. Appl. Microbiol. 84: 357 - 367 参照)、*C. サーモセルム* (*C. thermocellum*) マンナーゼ (Halstead et al., [1999] Microbiol. 145: 3101 - 3108 参照)、*D. サーモフィルム* (*D. thermophilum*) マンナーゼ (Gibbs et al., [1999] Curr. Microbiol. 39 (6): 351 - 357 参照)、*フラボバクテリウム* (*Flavobacterium*) 属種 マンナーゼ (Zakaria et al., [1998] Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 655 - 660 参照)、*G. プルモナタ* (*G. pulmonata*) マンナーゼ (Charrier and Rouland, [2001] J. Expt. Zool. 290: 125 - 135 参照)、*タマキビ* (*L. brevicula*) マンナーゼ (Yamamura et al., [1996] Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 674 - 676 参照)、*トマト* (*L. esculentum*) マンナーゼ (Filichkin et al., [2000] Plant Physiol. 134: 1080 - 1087 参照)、*P. カードラノリティカス* (*P. curdolanolyticus*) マンナーゼ (Pason and Ratanakhanokchai, [2006] Appl. Environ. Microbiol. 72: 2483 - 2490 参照)、*P. ポリミキサ* (*P. polymyxa*) マンナーゼ (Han et al., [2006] Appl. Microbiol. Biotechnol. 73 (3): 618 - 630 参照)、*P. クリソスポリウム* (*P. chryso sporium*) マンナーゼ (Wymelenberg et al., [2005] J. Biotechnol. 118: 17 - 34 参照)、*ピロミセス* (*Piromyces*) 属種 マンナーゼ (Fanutti et al., [1995] J. Biol. Chem. 270 (49): 29314 - 29322 参照)、*P. インスタルス* (*P. insulars*) マンナーゼ (Yamamura et al., [1993] Biosci. Biotechnol. Biochem. 7: 1316 - 1319 参照)、*P. フルオレッセンス亜種セルローサ* (*P. fluorescens subsp. cellulosa*) マンナーゼ (Braithwaite et al., [1995] Biochem J. 305: 1005 - 1010 参照)、*R. マリヌス* (*R. marinus*) マンナーゼ (Politz et al., [2000] Appl. Microbiol. Biotechnol. 53 (6): 715 - 721 参照)、*S. ロルフシ* (*S. rolfsii*) マンナーゼ (Sachslehner et al., [2000] J. Biotechnol. 80: 127 - 134 参照)、*S. ガルバス* (*S. galbus*) マンナーゼ (Kansoh and Nagieb, [2004] Anton. van. Leeuwenhoek. 85: 103 - 114 参照)、*S. リビダンス* (*lividans*) マンナーゼ (Arcand et al., [1993] J. Biochem. 290: 857 - 863 参照)、*T. ポリサッカロリティカム* (*T. Polysaccharolyticum*) マンナーゼ (Cann et al., [1999] J. Bacteriol. 181: 1643 - 1651 参照)、*T. フスカ* (*T. fusca*) マンナーゼ (Hilge et al., [1998] Structure 6: 1433 - 1444 参照)、*T. マリティマ* (*T. maritima*) マンナーゼ (Parker et al., [2001] Biotechnol. Bioeng. 75 (3): 322 - 333 参照)、*T. ネアポリタナ* (*T. neapolitana*) マンナーゼ

(Duffaud et al., [1997] Appl. Environ. Microbiol. 63:169-177 参照)、T.ハルジアナム(T. harzianum)株 T4 マンナーゼ(Franco et al., [2004] Biotechnol Appl. Biochem. 40:255-259 参照)、T.リーゼイ(T. reesei) マンナーゼ(Stalbrand et al., [1993] J. Biotechnol. 29:229-242 参照)、並びにビブリオ(Vibrio) 属種マンナーゼ(Tamaru et al., [1997] J. Ferment. Bioeng. 83:201-205 参照)が挙げられる。

#### 【0161】

適切な付加的マンナーゼとして、市販のエンド - - マンナーゼ、例えばHEMICELL (登録商標)(Chemgen); GAMANASE (登録商標)及びMANN AWAY (登録商標)(Novozymes A/S, Denmark); EFFECT ENZ (商標)M 1000、PREFERENZ (登録商標)M 100、PURABRITE (商標)、及びMANNASTAR (登録)(DuPont); 並びにPYROL ASE (登録商標)160及びPYROLASE (登録商標)200 (Diversa) が挙げられる。

#### 【0162】

他の実施形態において、本明細書中に記載される組成物は、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナーゼ変異体、及び1つ又は複数の付加的酵素を含む。1つ又は複数の付加的酵素は、アシルトランスフェラーゼ、アルファ - アミラーゼ、ベータ - アミラーゼ、アルファ - ガラクトシダーゼ、アラビノシダーゼ、アリアルエステラーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、カラギナーゼ、カタラーゼ、セロピオヒドラーゼ、セルラーゼ、コンドロイチナーゼ、クチナーゼ、エンド - ベータ - 1, 4 - グルカナーゼ、エンド - ベータ - マンナーゼ、エステラーゼ、エキソ - マンナーゼ、ガラクタナーゼ、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、ケラチナーゼ、ラッカーゼ、ラクターゼ、リグニナーゼ、リパーゼ、リポキシゲナーゼ、付加的マンナーゼ、メタロプロテアーゼ、オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチナーゼ、ペントサナーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、ブルナーゼ、リダクターゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ベータ - グルカナーゼ、タンナーゼ、トランスグルタミナーゼ、キシランアセチルエステラーゼ、キシランナーゼ、キシログルカナーゼ、キシロシダーゼ、及びそれらのあらゆる組合せ又は混合物から選択される。一部の実施形態は、アミラーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、プロテアーゼ、及び/又はセルラーゼのような従来の酵素を、本明細書中に記載される1つ若しくは複数のマンナーゼ変異体及び/又は1つ若しくは複数の付加的マンナーゼと併せて含む酵素の組合せ(すなわち「カクテル」)に関する。

#### 【0163】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、プロテアーゼを含む。一部の実施形態において、組成物は、プロテアーゼを、組成物の重量で約0.00001%~約10%含む。別の実施形態において、洗浄組成物は、プロテアーゼを、組成物の重量で約0.00001%~約10%、約0.001%~約5%、約0.001%~約2%、又は約0.005%~約0.5%含む。

#### 【0164】

一実施形態において、プロテアーゼはセリンプロテアーゼである。適切なプロテアーゼとして、動物、植物、又は微生物起源のものが挙げられる。一部の実施形態において、プロテアーゼは、微生物プロテアーゼである。他の実施形態において、プロテアーゼは、化学的に、又は遺伝的に改変された突然変異体である。別の実施形態において、プロテアーゼは、アルカリ微生物プロテアーゼ又はトリプシン様プロテアーゼである。例示的なアルカリプロテアーゼとして、例えば、バチルス(Bacillus) 属に由来するサブチリシン(例えば、サブチリシン、レントス(Lentus)、アミロリケファシエンス(a

10

20

30

40

50

myloli quefaciens)、サブチリシンCarlsberg、サブチリシン309、サブチリシン147、及びサブチリシン168)が挙げられる。例示的な付加的プロテアーゼとして、以下に限定されないが、国際公開第92/21760号パンフレット、国際公開第95/23221号パンフレット、国際公開第2008/010925号パンフレット、国際公開第09/149200号パンフレット、国際公開第09/149144号パンフレット、国際公開第09/149145号パンフレット、国際公開第10/056640号パンフレット、国際公開第10/056653号パンフレット、国際公開第2010/0566356号パンフレット、国際公開第11/072099号パンフレット、国際公開第2011/13022号パンフレット、国際公開第11/140364号パンフレット、国際公開第12/151534号パンフレット、国際公開第2015/038792号パンフレット、国際公開第2015/089447号パンフレット、国際公開第2015/089441号パンフレット、国際公開第2015/143360号パンフレット、国際公開第2016/061438号パンフレット、国際公開第2016/069548号パンフレット、国際公開第2016/069544号パンフレット、国際公開第2016/069557号パンフレット、国際公開第2016/069563号パンフレット、国際公開第2016/069569号パンフレット、国際公開第2016/069552号パンフレット、国際公開第2016/145428号パンフレット、米国特許出願公開第2008/0090747号明細書、米国特許第5801039号明細書、米国特許第5340735号明細書、米国特許第5500364号明細書、米国特許第5855625号明細書、RE34606号明細書、米国特許第5955340号明細書、米国特許第5700676号明細書、米国特許第6312936号明細書、米国特許第6482628号明細書、米国特許第8530219号明細書、米国仮特許出願第62/331282号明細書、米国仮特許出願第62/332417号明細書、米国仮特許出願第62/343618号明細書、及び米国仮特許出願第62/351649号明細書、並びにPCT出願PCT/US16/32514号明細書及びPCT/US2016/038245号明細書に記載されるもの、並びに国際公開第1999014341号パンフレット、国際公開第1999033960号パンフレット、国際公開第1999014342号パンフレット、国際公開第1999034003号パンフレット、国際公開第2007044993号パンフレット、国際公開第2009058303号パンフレット、国際公開第2009058661号パンフレット、国際公開第2014071410号パンフレット、国際公開第2014194032号パンフレット、国際公開第2014194034号パンフレット、国際公開第2014194054号パンフレット、及び国際公開第2014/194117号パンフレットに記載されるメタロプロテアーゼが挙げられる。例示的なプロテアーゼとして、以下に限定されないが、トリプシン(例えば、ブタ又はウシ起源のもの)、及び国際公開第89/06270号パンフレットに記載されるフザリウム(Fusarium)属プロテアーゼが挙げられる。例示的な市販のプロテアーゼとして、以下に限定されないが、MAXATASE(登録商標)、MAXACAL(商標)、MAXAPEM(商標)、OPTICLEAN(登録商標)、OPTIMASE(登録商標)、PROPERASE(登録商標)、PURAFECT(登録商標)、PURAFECT(登録商標) OXP、PURAMAX(商標)、EXCELLASE(商標)、PREFERENZ(商標)プロテアーゼ(例えば、P100、P110、P280)、EFFECTENZ(商標)プロテアーゼ(例えば、P1000、P1050、P2000)、EXCELLENZ(商標)プロテアーゼ(例えばP1000)、ULTIMASE(登録商標)及びPURAFAST(商標)(DuPont);ALCALASE(登録商標)、BLAZE(登録商標)、BLAZE(登録商標)EVITY(登録商標)、BLAZE(登録商標)EVITY(登録商標)16L、CORONASE(登録商標)、SAVINASE(登録商標)、SAVINASE(登録商標)ULTRA、SAVINASE(登録商標)EVITY(登録商標)、SAVINASE(登録商標)EVERIS(登録商標)、PRIMASE(登録商標)、DURAZYM(商標)、POLARZYME(登録商標)、OVOZYME(登録商標)、KANNAASE(登録商標)、L

10

20

30

40

50

IQUANASE (登録商標)、LIQUANASE EVERIS (登録商標)、NEUTRASE (登録商標)、PROGRESS UNO (登録商標)、RELEASE (登録商標) 及び ESPERASE (登録商標) (Novozymes); BLAP (商標) 及び BLAP (商標) 変異体 (Henkel); LAVERGY (商標) PRO 104L (BASF)、並びに KAP (B.アルカロフィラス (B.alkalophilus) サブチリシン (花王株式会社)) が挙げられる。

【0165】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、適切なアミラーゼを含む。一実施形態において、組成物は、アミラーゼを、組成物の重量で約0.00001%~約10%、約0.00001%~約10%、約0.001%~約5%、約0.001%~約2%、又は約0.005%~約0.5%含む。アルカリ溶液での使用に適したあらゆるアミラーゼ(例えば、アルファ及び/又はベータ)が、そのような組成物に含めるのに有用であり得る。例示的なアミラーゼは、化学的に、又は遺伝的に改変された突然変異体であってよい。例示的なアミラーゼとしては、限定されるものではないが、細菌又は真菌由来のアミラーゼが挙げられ、例えば、英国特許第1,296,839号明細書、国際公開第9100353号パンフレット、同第9402597号パンフレット、同第94183314号パンフレット、同第9510603号パンフレット、同第9526397号パンフレット、同第9535382号パンフレット、同第9605295号パンフレット、同第9623873号パンフレット、同第9623874号パンフレット、同第9630481号パンフレット、同第9710342号パンフレット、同第9741213号パンフレット、同第9743424号パンフレット、同第9813481号パンフレット、同第9826078号パンフレット、同第9902702号パンフレット、同第9909183号パンフレット、同第9919467号パンフレット、同第9923211号パンフレット、同第9929876号パンフレット、同第9942567号パンフレット、同第9943793号パンフレット、同第9943794号パンフレット、同第9946399号パンフレット、同第0029560号パンフレット、同第0060058号パンフレット、同第0060059号パンフレット、同第0060060号パンフレット、同第0114532号パンフレット、同第0134784号パンフレット、同第0164852号パンフレット、同第0166712号パンフレット、同第0188107号パンフレット、同第0196537号パンフレット、同第02092797号パンフレット、同第0210355号パンフレット、同第0231124号パンフレット、同第2004055178号パンフレット、同第2004113551号パンフレット、同第2005001064号パンフレット、同第2005003311号パンフレット、同第2005018336号パンフレット、同第2005019443号パンフレット、同第2005066338号パンフレット、同第2006002643号パンフレット、同第2006012899号パンフレット、同第2006012902号パンフレット、同第2006031554号パンフレット、同第2006063594号パンフレット、同第2006066594号パンフレット、同第2006066596号パンフレット、同第2006136161号パンフレット、同第2008000825号パンフレット、同第2008088493号パンフレット、同第2008092919号パンフレット、同第2008101894号パンフレット、同第2008/112459号パンフレット、同第2009061380号パンフレット、同第2009061381号パンフレット、同第2009100102号パンフレット、同第2009140504号パンフレット、同第2009149419号パンフレット、同第2010/059413号パンフレット、同第2010088447号パンフレット、同第2010091221号パンフレット、同第2010104675号パンフレット、同第2010115021号パンフレット、同第10115028号パンフレット、同第2010117511号パンフレット、同第2011076123号パンフレット、同第2011076897号パンフレット、同第2011080352号パンフレット、同第2011080353号パンフレット、同第2011080354号パンフレット、同第2011082425号パンフレット、同第2011

10

20

30

40

50



082429号パンフレット、同第2011087836号パンフレット、同第2011098531号パンフレット、同第2013063460号パンフレット、同第2013184577号パンフレット、同第2014099523号パンフレット、同第2014164777号パンフレット、及び同第2015077126号パンフレットに記載されているアミラーゼが挙げられる。例示的な市販のアミラーゼとしては、限定されるものではないが、AMPLIFY(登録商標)、AMPLIFY PRIME(登録商標)、DURAMYL(登録商標)、TERMAMYL(登録商標)、FUNGAMYL(登録商標)、STAINZYME PLUS(登録商標)、STAINZYME PLUS(登録商標)、STAINZYME ULTRA(登録商標)EVITY(登録商標)、及びBAN(商標)(Novozymes)、EFFECTENZ(商標)S1000、POWERASE(商標)、PREFERENZ(商標)S100、PREFERENZ(商標)S110、EXCELLENZ(商標)S2000、RAPIDASE(登録商標)、及びMAXAMYL(登録商標)P(DuPont)が挙げられる。

10

#### 【0166】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、適切なペクチン分解酵素を含む。本明細書中で用いられる「ペクチン分解酵素」は、アラビナーゼ(EC 3.2.1.99)、ガラクターゼ(EC 3.2.1.89)、ポリガラクトツロナーゼ(EC 3.2.1.15)、エキソ-ポリガラクトツロナーゼ(EC 3.2.1.67)、エキソ-ポリ-アルファ-ガラクトツロノシダーゼ(EC 3.2.1.82)、ペクチンリアーゼ(EC 4.2.2.10)、ペクチンエステラーゼ(EC 3.1.1.11)、ペクチン酸リアーゼ(EC 4.2.2.2)、エキソ-ポリガラクトツロ酸リアーゼ(EC 4.2.2.9)、及びヘミセルラーゼ、例えばエンド-1,3-キシロシダーゼ(EC 3.2.1.32)、キシラン-1,4-キシロシダーゼ(EC 3.2.1.37)、及び-L-アラビノフラノシダーゼ(EC 3.2.1.55)を包含する。ペクチン分解酵素は、上述の酵素活性物質の天然の混合物である。したがって、ペクチン酵素として、ペクチンメチルエステル結合を加水分解するペクチンメチルエステラーゼ、ガラクトツロン酸分子間のグリコシド結合を切断するポリガラクトツロナーゼ、及びペクチン酸に作用して、-1,4グリコシド結合の非加水分解切断をもたらして、ガラクトツロン酸の不飽和誘導体を形成するペクチントランスアミナーゼ又はリアーゼが挙げられる。

20

30

#### 【0167】

適切なペクチン分解酵素として、植物、真菌、又は微生物起源のものが挙げられる。一部の実施形態において、化学的に、又は遺伝的に改変された突然変異体が含まれる。一部の実施形態において、ペクチン分解酵素は、アルカリペクチン分解酵素、すなわち、酵素活性が、約7.0~約12のpHにて最大活性の少なくとも10%、少なくとも25%、又は少なくとも40%である酵素である。他の特定の実施形態において、ペクチン分解酵素は、約7.0~約12のpHにて最大活性を有する酵素である。アルカリペクチン分解酵素は、好アルカリ性微生物、例えば、細菌、真菌、及び酵母微生物、例えばバチルス(Bacillus)属種によって産生される。一部の実施形態において、微生物は、特開昭56-131376号公報及び特開昭56-068393号公報に記載されるB.フィルムス(B.firmus)、B.サーキュランス(B.circulans)、及び枯草菌(B.subtilis)である。アルカリペクチン分解酵素として、以下に限定されないが、ガラクトツラン-1,4-ガラクトツロナーゼ(EC 3.2.1.6.7)、ポリ-ガラクトツロナーゼ活性物質(EC 3.2.1.15)、ペクチンエステラーゼ(EC 3.1.1.11)、ペクチン酸リアーゼ(EC 4.2.2.2)、及びそれらのイソ酵素が挙げられ得る。アルカリペクチン分解酵素は、エルウィニア(Erwinia)属種により産生され得る。一部の実施形態において、アルカリペクチン分解酵素は、特開昭59-066588号公報、特開昭63-042988号公報、及びWorld J. Microbiol. Biotechnol. (8, 2, 115-120) 1992に記載されるように、E.クリサンテミ(E.chrysanthemii)、E.カロト

40

50

ボラ (*E. carotovora*)、*E. アミロボラ* (*E. amylovora*)、*E. ヘルビコラ* (*E. herbicola*)、及び *E. ジソルベンス* (*E. dissolvens*) によって産生される。他の特定の実施形態において、アルカリペクチン酵素は、JP 73006557号明細書及び *Agr. Biol. Chem.* (1972), 36(2) 285-93に開示されるように、バチルス属 (*Bacillus*) 種によって産生される。一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、ペクチン分解酵素を、組成物の重量で約 0.00001% ~ 約 10%、約 0.0001% ~ 約 10%、約 0.001% ~ 約 5%、約 0.001% ~ 約 2%、又は約 0.005% ~ 約 0.5% 含む。

#### 【0168】

一部の他の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、適切なキシログルカナーゼを含む。適切なキシログルカナーゼとして、以下に限定されないが、植物、真菌、又は細菌起源のものが挙げられる。化学的に、又は遺伝的に改変された突然変異体が、一部の実施形態において含まれる。本明細書中で用いられる「キシログルカナーゼ」は、Vincken及びVoragen (*Wageningen University*) [Vincken et al (1994) *Plant Physiol.*, 104, 99-107] によって記載される酵素のファミリーを包含し、そして Hayashi et al (1989) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 139-168 に記載されるように、キシログルカンを分解させることができる。Vinckenらは、トリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) (エンド-IV-グルカナーゼ) から精製されるキシログルカナーゼによる、単離したリンゴ細胞壁のセルロースからのキシログルカンコーティングの除去を実証した。この酵素は、細胞壁に埋もれたセルロースの酵素分解、及びペクチン酵素との相乗効果による働きを高める。DSM由来のラビダーゼ LIQ+ は、キシログルカナーゼ活性を含有する。一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、キシログルカナーゼを、組成物の重量で約 0.00001% ~ 約 10%、約 0.0001% ~ 約 10%、約 0.001% ~ 約 5%、約 0.001% ~ 約 2%、又は約 0.005% ~ 約 0.5% 含む。他の特定の実施形態において、特定の用途用のキシログルカナーゼは、アルカリキシログルカナーゼ、すなわち、酵素活性が、7から12に及ぶpHにて最大活性の少なくとも10%、少なくとも25%、又は少なくとも40%である酵素である。特定の他の実施形態において、キシログルカナーゼは、約7.0 ~ 約12のpHにて最大活性を有する酵素である。

#### 【0169】

一部の更なる実施形態において、本明細書中に記載される洗剤組成物はさらに、適切なセルラーゼを含む。一実施形態において、組成物は、セルラーゼを、組成物の重量で約 0.00001% ~ 約 10%、0.0001% ~ 約 10%、約 0.001% ~ 約 5%、約 0.001% ~ 約 2%、又は約 0.005% ~ 約 0.5% 含む。あらゆる適切なセルラーゼが、本明細書中に記載される組成物に用いられ得る。例示的なセルラーゼとして、化学的に、又は遺伝的に改変された突然変異体があり得る。例示的なセルラーゼとして、以下に限定されないが、細菌又は真菌起源のもの、例えば、国際公開第 2005054475号パンフレット、国際公開第 2005056787号パンフレット、米国特許第 7449318号明細書、米国特許第 7833773号明細書、米国特許第 4435307号明細書；EP 0495257号明細書；及び米国仮特許出願第 62/296678号明細書に記載されるものが挙げられる。例示的な市販のセルラーゼとして、以下に限定されないが、CELLUCLEAN (登録商標)、CELLUZYME (登録商標)、CAREZYME (登録商標)、ENDOLASE (登録商標)、RENOZYME (登録商標)、及び CAREZYME PREMIUM (Novozymes)；REVITALENZ (商標) 100、REVITALENZ (商標) 200/220、及び REVITALENZ (登録商標) 2000 (DuPont)；並びに KAC-500 (B) (商標) (花王株式会社) が挙げられる。一部の実施形態において、セルラーゼは、成熟した野

10

20

30

40

50

生型セルラーゼ又は変異型セルラーゼの、N末端の一部が欠失している部分又は断片として組み込まれる（例えば、米国特許第5874276号明細書参照）。

【0170】

更なる実施形態において、本明細書中に記載される洗剤組成物はさらに、適切なリパーゼを含む。一部の実施形態において、組成物は、リパーゼを、組成物の重量で約0.00001%～約10%、約0.00001%～約10%、約0.001%～約5%、約0.001%～約2%、又は約0.005%～約0.5%含む。例示的なリパーゼは、化学的に、又は遺伝的に改変された突然変異体であり得る。例示的なリパーゼとして、以下に限定されないが、例えば、細菌又は真菌起源のもの、例えば、*H. ラヌギノーザ* (*H. lanuginosa*) リパーゼ（例えば、EP258068号明細書及びEP305216号明細書参照）、*T. ラヌギノサス* (*T. lanuginosus*) リパーゼ（例えば、国際公開第2014/059360号パンフレット及び国際公開第2015/010009号パンフレット参照）、*リゾムコール・ミエヘイ* (*Rhizomucor miehei*) リパーゼ（例えばEP238023号明細書参照）、*カンディダ* (*Candida*) 属リパーゼ、例えば *C. アンタークティカ* (*C. antarctica*) リパーゼ（例えば、*C. アンタークティカ* (*C. antarctica*) リパーゼA又はB）（例えばEP214761号明細書参照）、*シュードモナス* (*Pseudomonas*) 属リパーゼ、例えば *P. アルカリゲネス* (*P. alcaligenes*) リパーゼ及び *P. シュードアルカリゲネス* (*P. pseudoalcaligenes*) リパーゼ（例えばEP218272号明細書参照）、*P. セパシア* (*P. cepacia*) リパーゼ（例えばEP331376号明細書参照）、*P. スタツェリ* (*P. stutzeri*) リパーゼ（例えばGB1372034号明細書参照）、*P. フルオレセンス* (*P. fluorescens*) リパーゼ、*バチルス* (*Bacillus*) 属リパーゼ（例えば枯草菌 (*B. subtilis*) リパーゼ (Dartois et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1131: 253-260 (1993))、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearoothermophilus*) リパーゼ（例えば特表昭64-744992号公報参照）、及び *B. プミルス* (*B. pumilus*) リパーゼ（例えば国際公開第91/16422号パンフレット参照）が挙げられる。クローニングされた例示的なリパーゼとして、以下に限定されないが、*ペニシリウム・カマンベルティ* (*Penicillium camemberti*) リパーゼ (Yamaguchi et al., *Gene* 103: 61-67 (1991) 参照)、*ゲオトリカム・カンディダム* (*Geotricum candidum*) リパーゼ (Schimada et al., *J. Biochem.*, 106: 383-388 (1989) 参照)、及び種々の *リゾプス* (*Rhizopus*) 属リパーゼ、例えば、*R. デレマー* (*R. delemar*) リパーゼ (Hass et al., *Gene* 109: 117-113 (1991) 参照)、*R. ニベアス* (*R. niveus*) リパーゼ (Kugimiya et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 716-719 (1992))、及び *ニホンコウジカビ* (*R. oryzae*) リパーゼが挙げられる。他の脂肪分解酵素、例えばクチナーゼもまた、本明細書中に記載される1つ又は複数の組成物に用いられ得、以下に限定されないが、例えば、*シュードモナス・メンドシナ* (*Pseudomonas mendocina*) に由来するクチナーゼ（国際公開第88/09367号パンフレット参照）及び/又は *フザリウム・ソラニピシ* (*Fusarium solanipisi*) に由来するクチナーゼ（国際公開第90/09446号パンフレット参照）が挙げられる。例示的な市販のリパーゼとして、以下に限定されないが、M1 LIPASE（商標）、LUMA FAST（商標）、及びLIPOMAX（商標）(DuPont)；LIPLEX（登録商標）、LIPOCLEAN（登録商標）、LIPOLASE（登録商標）、及びLIPOLASE（登録商標）ULTRA (Novozymes)；並びにLIPASE P（商標）(天野エンザイム株式会社)が挙げられる。

【0171】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、ペルオキシダ

10

20

30

40

50

ーゼを、過酸化水素又はそのソース（例えば、ペルカーボネート、ペルボレート、又はペルサルフェート）と組み合わせて含む。一部の代替の実施形態では、オキシダーゼは、酸素と組み合わせて使用される。両方のタイプの酵素は、「溶液漂白（solution bleaching）」のために（すなわち、洗い液中で複数の布地と一緒に洗われたときに染色された布地から他の布地へ織物染料が転移するのを防ぐために）、好ましくは増強剤とともに使用される（例えば、国際公開第94/12621号パンフレット及び同第95/01426号パンフレットを参照されたい）。適切なペルオキシダーゼ/オキシダーゼは、限定されるものではないが、植物、細菌、又は真菌由来のペルオキシダーゼ及び/又はオキシダーゼを含む。化学的又は遺伝子的に改変された突然変異体が一部の実施形態に含められる。一部の実施形態では、本開示の洗浄組成物は、この組成物の重量に対して約0.00001%～約10%、約0.0001%～約10%、約0.001%～約5%、約0.001%～約2%、約0.005%～約0.5%のペルオキシダーゼ及び/又はオキシダーゼをさらに含む。

10

#### 【0172】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、以下に限定されないが、ペルヒドロラーゼ（例えば国際公開第05/056782号パンフレット参照）が挙げられる付加的な酵素を含む。一部の実施形態は、上述の1つ又は複数のプロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、マンナーゼ、及び/又はセルラーゼの混合物に関する。

#### 【0173】

一部の実施形態は、洗浄組成物、例えば、米国特許第6605458号明細書に記載されるものに関する。一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物は、コンパクトな顆粒状の布地洗浄組成物である一方、他の実施形態では組成物は、着色された布地の洗濯に有用な顆粒状の布地洗浄組成物である。更なる実施形態において、組成物は、洗い容量について柔軟仕上げをもたらす顆粒状の布地洗浄組成物であり、更なる実施形態において、組成物は、重質液体（HDL）布地洗浄組成物である。他の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物は、布地洗浄組成物、例えば、米国特許第6610642号明細書及び米国特許第6376450号明細書に記載されるものである。代替の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物は、硬い表面の適切な洗浄組成物である。硬い表面の適切な洗浄組成物として、例えば、米国特許第6610642号明細書；米国特許第6376450号明細書；及び米国特許第6376450号明細書に記載されるものが挙げられる。更なる実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物は、食器洗い組成物である。一部の更なる実施形態において、本明細書中に記載される組成物は、オーラルケア組成物、例えば、米国特許第6376450号明細書及び米国特許第6605458号明細書に記載されるものである。上述の米国特許第6376450号明細書；米国特許第6605458号明細書；及び米国特許第6610642号明細書に含有される化合物及び洗浄補助物質の配合及び記載は、本発明のポリペプチドに用いられる。

20

30

#### 【0174】

更なる実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物は、布地柔軟仕上げ組成物、例えば、GB400898号明細書、GB514276号明細書、EP0011340号明細書、EP0026528号明細書、EP0242919号明細書、EP0299575号明細書、EP0313146号明細書、及び米国特許第5019292号明細書に記載されるものである。

40

#### 【0175】

本明細書中に記載される洗浄組成物は、適切なあらゆる形態に製剤化され得、且つ製剤者によって選択されるあらゆるプロセスによって調製され得、それらの非限定的な例が、米国特許第5879584号明細書；米国特許第5691297号明細書；米国特許第5574005号明細書；米国特許第5569645号明細書；米国特許第5565422号明細書；米国特許第5516448号明細書；米国特許第5489392号明細書；及び米国特許第5486303号明細書に記載されている。低いpHの洗浄組成物が所望さ

50

れる場合、そのような組成物の pH は、モノエタノールアミン等の物質、又は HCl 等の酸性物質の付加により調整される。

【0176】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物は、タブレット、カプセル、サシェ、パウチ、シート、及び多区画パウチが挙げられる単位用量形態で提供される。一部の実施形態において、単位用量形式は、多区画パウチ（又は他の単位用量形式）内の成分の放出制御を実現するように設計される。適切な単位用量及び放出制御形式が、当該技術分野において知られている（例えば、EP 2 1 0 0 9 4 9 号明細書、EP 2 1 0 0 9 4 7 号明細書、国際公開第 0 2 / 1 0 2 9 5 5 号パンフレット、国際公開第 0 4 / 1 1 1 1 7 8 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 3 / 1 6 5 7 2 5 号パンフレット、並びに米国特許第 4 7 6 5 9 1 6 号明細書及び米国特許第 4 9 7 2 0 1 7 号明細書参照）。一部の実施形態において、単位用量形態は、水溶性フィルム又は水溶性パウチで包まれたタブレットによって実現される。

10

【0177】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、少なくとも 1 つのキレート剤を含む。適切なキレート剤として、以下に限定されないが、銅キレート剤、鉄キレート剤、及び/又はマンガンキレート剤、並びにそれらの混合物が挙げられ得る。少なくとも 1 つのキレート剤が使用される実施形態では、本開示の洗浄組成物は、この洗浄組成物の重量に対して約 0.1% ~ 約 15%、又はさらに約 3.0% ~ 約 10% のキレート剤を含む。

20

【0178】

一部のなお更なる実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、少なくとも 1 つの沈着助剤をさらに含む。適切な沈着助剤としては、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリカルボン酸塩、防汚ポリマー、例えば、ポリテレフタル酸、粘土、例えば、カオリナイト、モンモリロナイト、アタプルガイト、イライト、ベントナイト、ハロイサイト、及びこれらの混合物が挙げられる。

【0179】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、少なくとも 1 つの再付着防止剤を含む。一部の実施形態において、再付着防止剤は、例えば、EP 2 1 0 0 9 4 9 号明細書に記載される非イオン性界面活性剤である。自動食器洗いの一部の実施形態において、非イオン性界面活性剤が、特に敷布地用の表面改変剤として、被膜形成及び染み形成を回避するのに、且つ光沢を向上させるのに用いられる。

30

【0180】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、1 つ以上の染料転移抑制剤を含む。適切なポリマー性染料転移抑制剤としては、限定されるものではないが、ポリビニルピロリドンポリマー、ポリアミン N - オキシドポリマー、N - ビニルピロリドンと N - ビニルイミダゾールとのコポリマー、ポリビニルオキサゾリドン、及びポリビニルイミダゾール、又はこれらの混合物をさらに含む。本明細書中に記載される洗浄組成物は、この洗浄組成物の約 0.0001 重量% ~ 約 10 重量%、約 0.01 重量% ~ 約 5 重量%、又はさらに約 0.1 重量% ~ 約 3 重量% の染料転移抑制剤を含む。

40

【0181】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、ケイ酸塩をさらに含む。一部のこのような実施形態では、ケイ酸ナトリウム（例えば、二ケイ酸ナトリウム、メタケイ酸ナトリウム、及び結晶性フィロケイ酸塩）を使用することができる。一部の実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、この組成物の約 1% ~ 約 20%、約 5 重量% ~ 約 15 重量% のケイ酸塩を含む。

【0182】

一部のなお更なる実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、1 つ又は複数の分散剤をさらに含む。適切な水溶性有機物質は、限定されるものではないが、ホモ若しくはコポリマー酸又はこれらの塩を含み、このポリカルボン酸は、2 つ以下の炭素原子に

50

よって互いに隔てられている少なくとも2つのカルボキシ基を含む。

#### 【0183】

一部の更なる実施形態では、洗浄組成物に使用される酵素は、任意の適切な技術によって安定化される。一部の実施形態では、本明細書で利用される酵素は、完成組成物中のカルシウム及び/又はマグネシウムイオンの水溶性源の存在によって安定化される。一部の実施形態では、酵素安定剤としては、オリゴ糖、多糖、及び無機二価金属塩が挙げられ、この無機二価金属塩は、アルカリ土類金属塩、例えば、カルシウム塩を含む。酵素安定化のための様々な技術を本明細書で使用できることが企図される。例えば、一部の実施形態では、本明細書で利用される酵素は、完成組成物中の亜鉛(II)イオン、カルシウム(II)イオン、及び/又はマグネシウム(II)イオン、並びに他の金属イオン(例えば、バリウム(II)、スカンジウム(II)、鉄(II)、マンガン(II)、アルミニウム(III)、スズ(II)、コバルト(II)、銅(II)、ニッケル(II)、及びオキソバナジウム(IV))の水溶性源の存在によって安定化される。塩化物及び硫酸塩も、一部の実施形態に使用することができる。適切なオリゴ糖及び多糖(例えば、デキストリン)の例は、当技術分野で公知である(例えば、国際公開第07/145964号パンフレットを参照されたい)。一部の実施形態では、可逆的プロテアーゼ阻害剤、例えば、ホウ素含有化合物(例えば、ホウ酸塩、4-ホルミルフェニルホウ酸)及び/又はトリペプチドアルデヒドも、安定性をさらに改善するために使用することができる。

10

#### 【0184】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、1つ又は複数の漂白剤、漂白活性化剤、及び/又は漂白触媒をさらに含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、無機及び/又は有機漂白化合物を含む。無機漂白剤としては、限定されるものではないが、過水和物塩(例えば、過ホウ酸塩、過炭酸塩、過リン酸塩、過硫酸塩、及び過ケイ酸塩)が挙げられ得る。一部の実施形態では、無機過水和物塩はアルカリ金属塩である。一部の実施形態では、無機過水和物塩は、追加の保護なしに結晶性固体として含められるが、一部の別の実施形態では、この塩は被覆される。適切な塩として、例えば、EP2100949号明細書に記載されるものが挙げられる。漂白活性化剤は、典型的には、60以下の温度での洗浄の過程で漂白作用を高める有機過酸前駆体である。本明細書で使用するのに適した漂白活性化剤は、過加水分解条件下で、好ましくは約1~約10の炭素原子、特に約2~約4の炭素原子を有する脂肪族ペルオキシカルボン酸、及び/又は任意選択で置換される過安息香酸を与える化合物を含む。適切な漂白活性化剤として、例えば、EP2100949号明細書に記載されるものが挙げられる。漂白触媒として典型的に、例えば、マンガントリアザシクロノナン及び関連する錯体、並びにコバルト、銅、マンガン、及び鉄の錯体が、そして米国特許第4246612号明細書；米国特許第5227084号明細書；米国特許第4810410号明細書；並びに国際公開第99/06521号パンフレット及びEP2100949号明細書に記載されるものが挙げられる。

20

30

#### 【0185】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される洗浄組成物はさらに、1つ又は複数の触媒金属錯体を含む。他の実施形態では、金属含有漂白触媒を使用することができる。一部の実施形態では、金属漂白触媒は、指定された漂白触媒活性の遷移金属カチオン(例えば、銅、鉄、チタン、ルテニウム、タングステン、モリブデン、又はマンガンのカチオン)、漂白触媒活性を殆ど又は全く有しない補助金属カチオン(例えば、亜鉛又はアルミニウムカチオン)、触媒及び補助金属カチオンに対して指定された安定性定数を有する封鎖剤、特にエチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四(メチレンホスホン酸)、及びこれらの水溶性塩を含む触媒系を含む(例えば、米国特許第4,430,243号明細書を参照されたい)。一部の実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、マンガ化合物によって触媒される。このような化合物及び使用のレベルは、当技術分野で周知である(例えば、米国特許第5,576,282号明細書を参照されたい)。更なる実施形態では、コバルト漂白触媒を、本明細書中に記載される洗浄組成物に使用することがで

40

50

きる。様々なコバルト漂白触媒が、当技術分野で公知であり（例えば、米国特許第 5, 597, 936 号明細書、及び同第 5, 595, 967 号明細書を参照されたい）、公知の方法によって容易に調製される。

【0186】

一部の更なる実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、マクロ多環式剛性リガンド（MRL）の遷移金属錯体をさらに含む。実際の問題として、かつ限定としてではなく、一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物及び洗浄プロセスは、水性洗い媒体中に少なくとも 1 億分の 1 部程度の活性 MRL 種を提供するように調整され、他の実施形態では、洗い液中に約 0.005 ppm ~ 約 25 ppm、約 0.05 ppm ~ 約 10 ppm、又は約 0.1 ppm ~ 約 5 ppm の MRL を提供する。

10

【0187】

一部の実施形態では、本遷移金属漂白触媒中の遷移金属は、限定されるものではないが、マンガ、鉄、及びクロムを含む。他の実施形態では、MRL は、限定されるものではないが、架橋された特別な超剛性リガンド（例えば、5, 12 - ジエチル - 1, 5, 8, 12 - テトラアザピシクロ [6.6.2] ヘキサデカン）を含む。適切な遷移金属 MRL は、公知の方法によって容易に調製される（例えば、国際公開第 2000/32601 号パンフレット及び米国特許第 6, 225, 464 号明細書を参照されたい）。

【0188】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、金属クリーナー剤（metal care agent）をさらに含む。金属クリーナー剤は、アルミニウム、ステンレス鋼、及び非鉄金属（例えば、銀及び銅）を含む金属の変色、腐食、及び / 又は酸化の防止及び / 又は低減に使用することができる。適切な金属クリーナー剤は、EP 2100949 号明細書、国際公開第 94/26860 号パンフレット、及び同第 94/26859 号パンフレットに記載された金属クリーナー剤を含む。一部の実施形態では、金属クリーナー剤は亜鉛塩である。一部の更なる実施形態では、本明細書中に記載される洗浄組成物は、約 0.1 重量% ~ 約 5 重量% の 1 つ以上の金属クリーナー剤を含む。

20

【0189】

本明細書中に記載される洗浄組成物は、表面、皿類、又は布地を洗浄するのに用いられ得る。典型的には、表面、皿類、又は布地の少なくとも一部が、少なくとも 1 つの（i）本明細書中に記載される変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片、あるいは（ii）本明細書中に記載される少なくとも 1 つの洗浄組成物と接触してから、表面、皿類、又は布地は、場合によっては洗われ、且つ / 又は濯がれる。本開示の目的のために、「洗い」は、以下に限定されないが、こすり洗い及び機械的撹拌を含む。一部の実施形態において、洗浄組成物は典型的に、溶液中約 500 ppm ~ 約 15,000 ppm の濃度にて使用される。洗い溶媒が水である場合、水の温度は典型的に、約 5 ~ 約 90 に及び、そして布地が包含される場合、水対布地の質量比は典型的に、約 1 : 1 ~ 約 30 : 1 である。

30

【0190】

一部の実施形態は、洗浄方法であって、（i）本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片、あるいは（ii）本明細書中に記載される洗浄組成物の有効量を、マンナンを含む汚れ又は染みを含むアイテム又は表面と接触させて、汚れ又は染みに含有されるマンナンを加水分解することを含む洗浄方法に関する。

40

【0191】

一部の実施形態において、本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、織物及び布地から選択される 1 つ又は複数のアイテム上のバイオフィルムを阻止し、削減し、且つ / 又は除去するのに用いられる。

【0192】

本明細書中に記載される 1 つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプ

50

チド若しくは活性断片は、以下に限定されないが、マンナン、ガラクトマンナン、及びグルコマンナンが挙げられる、マンノース単位を含有する多糖鎖を加水分解することで、そのようなポリペプチドが、1,4-Dマンノシド結合を含有する多糖基質に關与するマンナン加水分解反応を実行するのに特に有用となる。一般的には、ドナー分子は、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の存在下で、マンナン加水分解反応を実行するのに適した条件下でインキュベートされ、場合によっては、その後、反応から産物が単離される。これ以外にも、食品の文脈では、製品は、単離されない食品の成分となり得る。特定の実施形態において、ドナー分子は、以下に限定されないが、マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、及びガラクトグルコマンナンが挙げられる、マンノース単位を含む多糖鎖である。

10

#### 【0193】

一実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、パーム核油を抽出するプロセスに用いられる。別の実施形態は、パーム核又はパーム核ミールからパーム核油を抽出するプロセスであって、パーム核及び/又はパーム核ミールを用意することと、前記種子又はケーキを、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片で処理することを含むプロセスに関する。

#### 【0194】

一実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含む組成物は、動物の飼料又は人間の食物を加工し、且つ/又は製造するのに用いられる。更なる実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ヒト以外の動物用の飼料への添加物であり得る。別の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、人間の食物に、例えば人間の食物への添加物として、有用であり得る。

20

#### 【0195】

いくつかの栄養因子が、動物の飼料及び人間の食物を調製するのに用いられ得る安価な植物材料の量を制限するおそれがある。例えば、オリゴマンナン、例えばマンナン、ガラクトマンナン、グルコマンナン、及びガラクトグルコマンナンを含有する植物材料は、栄養化合物、例えば鉱物、ビタミン、糖、及び脂肪を消化吸収する動物の能力を引き下げおそれがある。当該悪影響は、特に、マンナン含有ポリマーの高い粘度に、そして栄養化合物を吸収するマンナン含有ポリマーの能力に起因する。当該影響は、飼料中に、マンナン含有ポリマーを分解する酵素、例えば本明細書中に記載されるエンド-マンナーゼ酵素を含めることによって引き下げられ得、これにより、安価な植物材料中に典型的に見出されるマンナン含有ポリマーがより高い割合で飼料中に含まれてよく、このことで最終的に飼料のコストが引き下げられる。加えて、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、マンナン含有ポリマーをより単純な糖に分解することができ、これは、より容易に同化されて、付加的なエネルギーを提供することができる。

30

#### 【0196】

更なる実施形態において、植物材料を含有する動物の飼料は、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の存在下で、マンナン含有ポリマーを分解するのに適した条件下で、インキュベートされる。

40

#### 【0197】

別の実施形態において、パン改良組成物が、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を、場合によってはマンナン、グルコマンナン、又はガラクトマンナンのソースと組み合わせ、そしてさらに場合によっては、1つ又は複数の他の酵素と組み合わせ、含む。

#### 【0198】

用語「ヒト以外の動物」は、全ての非反芻動物及び反芻動物を含む。特定の実施形態に

50



において、非反芻動物は、以下に限定されないが、ウマ、並びに単胃動物、例えば、以下に限定されないが、ブタ、家禽、及び魚からなる群から選択される。更なる実施形態において、ブタは、以下に限定されないが、子ブタ、成長中のブタ、及び雌ブタであってよく；家禽は、以下に限定されないが、シチメンチョウ、カモ、及びニワトリ（以下に限定されないが、ブロイラー雛及びレイヤーが挙げられる）であってよく；そして魚は、以下に限定されないが、サケ、マス、ティラピア、ナマズ、及びコイ；並びにエビが挙げられるがこれに限定されない甲殻類であってよい。更なる実施形態において、反芻動物は、以下に限定されないが、ウシ、若いカーフ、ヤギ、ヒツジ、キリン、バイソン、ムース、ヘラジカ、ヤク、スイギュウ、シカ、ラクダ、アルパカ、ラマ、アンテロープ、プロングホーン、及びニルガイからなる群から選択される。

10

## 【0199】

一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、飼料添加物としての代わりに、飼料を前処理するのに用いられる。一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、離乳したてのブタ、保育中のブタ、子ブタ、肥育中のブタ、成長中のブタ、仕上げブタ、産卵鶏、ブロイラー雛、及びシチメンチョウ用の飼料に加えられ、又はこれを前処理するのに用いられる。

## 【0200】

別の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、植物材料、例えばパーム核、ココナッツ、コンニャク、ローカストビーンガム、グアーガム、ダイズ、オオムギ、エンバク、アマ、コムギ、トウモロコシ、アマニ、柑橘類の果肉、綿実、ラッカセイ、ナタネ、ヒマワリ、エンドウ、及びルピナス由来の飼料に加えられ、又はこれを前処理するのに用いられる。

20

## 【0201】

本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、熱安定性であり、そして結果として、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ペレット化された飼料を生産するプロセスに用いられ得、そこではペレット化工程前に熱が飼料混合物に加えられる。別の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、ペレット化工程に先立って他の飼料成分に、又はペレット化工程の後に他の飼料成分に（すなわち、すでに形成された飼料ペレットに）加えられる。

30

## 【0202】

さらに別の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を含有する食物プロセッシング組成物又は飼料補助剤組成物は、場合によってはさらに、着色剤、芳香化合物、安定化剤、ビタミン、鉱物、及び他の飼料又は食物増強酵素から選択される他の置換基を含有してよい。これは、いわゆるプレミックスに特に当てはまる。

## 【0203】

更なる実施形態において、本発明に従う食品添加物は、他の食物成分、例えば禾穀類タンパク質又は植物タンパク質と適切な量で組み合わせられて、加工された食品が形成されてよい。

40

## 【0204】

一実施形態において、動物の飼料組成物及び／又は動物の飼料添加組成物及び／又はペットフードが、本明細書中に記載されるポリペプチドを含む。

## 【0205】

別の実施形態は、動物の飼料組成物及び／又は動物の飼料添加組成物及び／又はペットフードを調製する方法であって、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を、1つ又は複数の、動物の飼料成分及び／又は動物の飼料添加成分及び／又はペットフード成分と混合することを含む方法に関する。

## 【0206】

50

更なる実施形態は、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の、動物の飼料成分及び/又は動物の飼料添加成分及び/又はペットフードを調製するための使用に関する用語「ペットフード」は、家庭動物、例えば、イヌ、ネコ、スナネズミ、ハムスター、チンチラ、ファンシーラット、モルモット；鳥類ペット、例えば、カナリア、インコ、及びオウム；爬虫類ペット、例えば、カメ、トカゲ、及びヘビ；水生動物、例えば、熱帯魚及びカエル用の試料を意味すると理解されるものとする。

【0207】

用語「動物飼料組成物」、「試料」、及び「飼い葉」は、互換的に使用され、以下の群から選択される1つ以上の動物飼料材料を含み得る：(a) 穀類、例えば、小さい穀物（例えば、小麦、大麦、ライ麦、オート麦、及びこれらの組み合わせ）、及び/又は大きい穀物、例えば、トウモロコシ又はモロコシなどの大粒；(b) 穀類からの副産物、例えば、トウモロコシグルテンミール、DDGS (Distillers Dried Grain Solubles) (特にトウモロコシをベースとするDDGS (cDDGS)、小麦ふすま、小麦ミドリング (wheat middling)、小麦ショーツ、米ぬか、籾殻、オート麦、パーム核、及び柑橘類果肉；(c) 供給源、例えば、大豆、ヒマワリ、ピーナッツ、ルピナス、エンドウマメ、ソラマメ、綿、カノーラ、魚粉、乾燥血漿タンパク質、肉骨粉、ジャガイモタンパク質、ホエイ、コブラ、及びゴマから得られるタンパク質；(d) 植物及び動物起源から得られる油及び脂肪；及び(e) 鉱物及びビタミン。

【0208】

一態様において、食物組成物又は食物添加物は、液体であっても固体であってもよい。

【0209】

本発明の態様において、食物組成物は、以下に限定されないが発酵飲料、例えばビール及びワインが挙げられる飲料である。

【0210】

本発明の文脈では、用語「発酵飲料」は、発酵プロセス、例えば微生物発酵、例えば細菌発酵及び/又は酵母発酵を含む方法によって生産されるあらゆる飲料を含むことを意味する。

【0211】

本発明の態様において、発酵飲料は、ビールである。用語「ビール」は、デンプン含有植物材料の発酵/醸造によって生産されるあらゆる発酵麦汁を含むことを意味する。多くの場合、ビールは、麦芽、又はデンプン含有植物材料としての補助剤、又は麦芽及び補助剤のあらゆる組合せから生産される。本明細書中で用いられる用語「麦芽」は、あらゆる禾穀類穀粒麦芽、例えばオオムギ麦芽又はコムギ麦芽として理解される。

【0212】

本明細書中で用いられる用語「補助剤」は、麦芽でない、例えばオオムギ麦芽でもコムギ麦芽でもないあらゆるデンプン及び/又は糖含有植物材料を指す。補助剤の例として、例えば、一般的なトウモロコシグリッツ、精製トウモロコシグリッツ、醸造者の粉碎酵母、イネ、モロコシ、精製コーンスターチ、オオムギ、オオムギデンプン、脱穀オオムギ、コムギ、コムギデンプン、加熱乾燥した (torried) 禾穀類、禾穀類フレーク、ライムギ、エンバク、ジャガイモ、タピオカ、キャッサバ、並びにシロップ、例えばトウモロコシシロップ、サトウキビシロップ、転化糖シロップ、オオムギシロップ、及び/又はコムギシロップ等が挙げられ、これらがデンプンのソースとして用いられ得る。

【0213】

本明細書中で用いられる用語「マッシュ」は、穀粉等のあらゆるデンプン及び/又はシュガー含有植物材料の水性スラリーを指し、例えば、水と混合された後に、麦汁及び使い終わった穀粒に分離される、破碎オオムギ麦芽、破碎オオムギ、及び/若しくは他の補助剤又はそれらの組合せを含む。

【0214】

本明細書中で用いられる用語「麦汁」は、マッシング中の穀粉の抽出後に溢れ出した非

発酵液を指す。

【0215】

別の態様において、本発明は、発酵飲料、例えばビールを調製する方法であって、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を、麦芽及び/又は補助剤と混合することを含む方法に関する。

【0216】

ビールの例は：十分な麦芽で造られたビール、「Reinheitsgebot」の下で醸造されたビール、エール、IPA、ラガー、ピター、発泡酒（第2のビール）、第3のビール、ドライビール、ニアビール、ライトビール、低アルコールビール、低カロリービール、ポーター、ボックビール、スタウト、麦芽リカー、ノンアルコールビール、ノンアルコール麦芽リカー等、並びに代替の禾穀類飲料及び麦芽飲料、例えば果実風味の麦芽飲料、例えば柑橘風味の、例えばレモン、オレンジ、ライム、若しくはベリー風味の麦芽飲料；リカー風味の麦芽飲料、例えば、ウォッカ、ラム、若しくはテキーラ風味の麦芽リカー；又はコーヒー風味の麦芽飲料、例えばカフェイン風味の麦芽リカー；等を含む。

10

【0217】

本発明の一態様は、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の、発酵飲料、例えばビールの生産における使用に関する。

【0218】

別の態様は、発酵飲料を提供する方法であって、マッシュ及び/又は麦汁を、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片と接触させる工程を含む方法に関する。

20

【0219】

更なる態様は、発酵飲料を提供する方法であって：(a)マッシュを調製する工程と、(b)当該マッシュを濾過して、麦汁を得る工程と、(c)当該麦汁を発酵させて、発酵飲料、例えばビールを得る工程とを含み、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片が：(i)工程(a)のマッシュ、及び/又は(ii)工程(b)の麦汁、及び/又は(iii)工程(c)の麦汁に加えられる、方法に関する。

【0220】

さらに別の態様に従えば、(1)マッシュ及び/又は麦汁を、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片と接触させる工程；及び/あるいは(2)(a)マッシュを調製する工程、(b)当該マッシュを濾過して、麦汁を得る工程、(c)当該麦汁を発酵させて、発酵飲料、例えばビールを得る工程を含み、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片が：(i)工程(a)のマッシュ、及び/又は(ii)工程(b)の麦汁、及び/又は(iii)工程(c)の麦汁に加えられる、方法によって、発酵飲料、例えばビールが生産又は提供される。

30

【0221】

一般的には、コーヒー抽出液は、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の存在下で、液体コーヒー抽出液中に存在するガラクトマンナンを加水分解するのに適した条件下でインキュベートされる。

40

【0222】

別の態様において、本発明は、バイクド製品を調製する方法であって、本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を生地に加えてから、当該生地を焼くことを含む方法に関する。バイクド製品の例は、当業者に周知であり、パン、ロールパン、パフペストリー、甘い発酵生地、パンズ、ケーキ、クラッカー、クッキー、ビスケット、ワッフル、ウェハース、トルティーヤ、朝食のシリアル、押し製品等が挙げられる。

【0223】

本明細書中に記載されるマンナナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活

50

性断片は、パン改良剤組成物の一部として生地に加えられる。パン改良剤は、種々の成分を含有する組成物であり、生地の特性、及びベーカリー製品、例えばパン及びケーキの品質を向上させる。パン改良剤は多くの場合、その有益な影響、例えば生地の安定性、並びにパンの質感及び容量のため、産業的なベーカリープロセスに加えられる。パン改良剤は通常、脂肪及び油、並びに乳化剤、酵素、酸化防止剤、酸化剤、安定化剤、及び還元剤のような添加物を含有する。本発明のいずれかのポリペプチドに加えて、パン改良剤中に存在してもよいし、それ以外では本発明のいずれかのポリペプチドと併用されてもよい他の酵素として、アミラーゼ、ヘミセルラーゼ、アミロース分解性複合体、リパーゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼ、ペクチナーゼ、プルランナーゼ、非デンプン性多糖分解酵素、及びグルコースオキシダーゼ、リポキシゲナーゼ、又はアスコルビン酸オキシダーゼのようなレドックス酵素が挙げられる。

10

#### 【0224】

一実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、生地にはパン改良剤組成物の一部として加えられてよく、これはまた、グルコマンナン及び/又はガラクトマンナンソース、例えばコンニャクガム、グアーガム、ローカストビーンガム（イナゴマメ（*Ceratonia siliqua*））、コブラミール、アイボリーナットマンナン（オオミゾウゲヤシ（*Phytelphas macrocarpa*））、海草マンナン抽出物、ココナッツミール、及び醸造酵母の細胞壁（乾燥していてもよいし、醸造酵母抽出液の形態で用いられてもよい）も含む。本発明に用いられる他の許容可能なマンナン誘導體として、枝状に分かれていない - 1, 4 - 結合したマンナンホモポリマー及びマンノオリゴサッカライド（マンノピオース、マンノトリオース、マンノテトラオース、及びマンノペントース）が挙げられる。本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、単独で用いられてもよいし、生地の寛容性；生地の可撓性及び/又は生地の粘着性；及び/又はパン粉の構造、並びにパンのステーリングの遅延（*retarding staling*）を向上させるために、グルコマンナン及び/又はガラクトマンナン及び/又はガラクトグルコマンナンと併用されてもよい。別の態様において、マンナーゼ加水分解物は、可溶性のプレバイオティクス、例えばマンノオリゴサッカライド（*MOS*）として作用し、これは、結腸中で好ましい集団密度にて見出される場合に、良好な健康状態と一般的に関連する乳酸菌の増殖を促進する。

20

30

#### 【0225】

一態様において、本発明のいずれかのポリペプチドが加えられる生地は、純粋な小麦粉に加えて、又はその代わりに、ブラン、又はエンバク、イネ、雑穀、トウモロコシ、又は豆類の粉を含む（すなわち、純粋な白色の小麦粉生地でない）。

#### 【0226】

別の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、乳又は他のあらゆる乳製品に加えられる。これには、グルコマンナン及び/又はガラクトマンナンも加えられている。典型的なグルコマンナン及び/又はガラクトマンナンソースは、ベーカリーの態様において先で一覽にされており、グアー又はコンニャクガムが挙げられる。本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片の、グルコマンナン及び/又はガラクトマンナンとの組合せは、マンナーゼ加水分解物（マンノオリゴサッカライド）を放出し、これは、大腸又は結腸中で好ましい集団密度にて見出される場合に、良好な健康状態と一般的に関連するプロバイオティック細菌（とりわけビフィドバクテリウム（*Bifidobacteria*）属及びラクトバチルス（*Lactobacillus*）属乳酸菌）の選択的な増殖を促進することによって、可溶性のプレバイオティクスとして作用する。

40

#### 【0227】

別の態様は、乳又は乳製品を調製する方法であって、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片、及びあらゆるグルコマンナ

50

ン、ガラクトマンナン、又はガラクトグルコマンナンを加えることを含む方法に関する。

【0228】

別の態様において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、プレバイオティックマンナン加水分解物を含む乳業ベースの食品を生産するために、乳業ベースの食品に加えられる前に、又は加えられた後に、あらゆるグルコマンナン又はガラクトマンナンと併用される。更なる態様において、このように生産されたマンノオリゴサッカライド含有乳製品は、有益なヒト腸内マイクロフローラの集団を増大させることができ、そして更なる態様において、乳業ベースの食品は、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片を、グルコマンナン及び/又はガラクトマンナン及び/又はガラクトグルコマンナンのあらゆるソース、並びにヒト大腸において有益であることが知られている細菌（例えばビフィドバクテリウム（*Bifidobacteria*）属及びラクトバチルス（*Lactobacillus*）属）の少なくとも1つの株の接種に十分な用量と一緒に含んでよい。一態様において、乳業ベースの食品は、ヨーグルト又は乳飲料である。

10

【0229】

本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はさらに、紙パルプ、例えば化学パルプ、半化学パルプ、クラフトパルプ、機械パルプ、及び亜硫酸塩法によって調製されるパルプの酵素補助漂白に用いられる。一般的には、紙パルプは、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片と、紙パルプを漂白するのに適した条件下でインキュベートされる。

20

【0230】

一部の実施形態において、パルプは、酸素、オゾン、パーオキシド、又はペルオキシ酸で漂白された塩素フリーのパルプである。一部の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、低いリグニン含有量を示す、改変され、又は連続的なパルプ化法によって生産されたパルプの酵素補助漂白に用いられる。一部の他の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、単独で、又は好ましくはキシラーゼ及び/又はエンドグルカナーゼ及び/又はアルファ-ガラクトシダーゼ及び/又はセロビオヒドラーゼ酵素と組み合わせられて、使用される。

【0231】

グアーガム及びローカストビーンガム等のガラクトマンナンは、例えば食物（例えばアイスクリーム）、及び織物印刷用の印刷ペースト、例えばTシャツへの印刷物中で、増粘剤として広く用いられる。ゆえに、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片はまた、マンナン含有基質の厚さ又は粘度の引下げに用いられる。一部の実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、食物（例えばアイスクリーム）中のガラクトマンナンを加水分解して廃棄流を形成するのに用いられる。特定の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、加工装置内の残留食物の粘度を引き下げることによって、加工後の洗浄を促進するのに用いられる。特定の他の実施形態において、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、印刷ペーストの粘度を引き下げることによって、織物印刷後の過剰印刷ペーストの洗いを促進するのに用いられる。一般的には、マンナン含有基質は、本明細書中に記載されるマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片と、マンナン含有基質の粘度を引き下げるのに適した条件下でインキュベートされる。

30

40

【0232】

更なる実施形態において、本明細書中に記載される1つ又は複数のマンナーゼ変異体、又はその組換えポリペプチド若しくは活性断片は、油ガス業界において、例えば、掘削液の粘度を制御し；水圧破碎に用いられる流体が、ボアホールから岩中に延びる地下部の破損を生じさせる割合を増大させ；ボアホールの濾過ケーキを洗浄し；且つそれらを組み

50

合わせて行うのに用いられ得る。

【0233】

本組成物及び本方法の他の態様及び実施形態が、上述の記載及び以下の実施例から明らかとなろう。本明細書中に記載される実施形態を越える種々の代替の実施形態が、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく本発明を実行する際に使用され得る。したがって、本明細書中に記載される特定の実施形態ではなく特許請求の範囲が、本発明の範囲を定義する。したがって、特許請求の範囲内の方法及び構造、並びにそれらの等価物は、特許請求の範囲によって包含される。

【実施例】

【0234】

実施例1

パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属種マンナーゼ PspMan138 のクローニング及び発現

パエニバチルス属 (*Paenibacillus*) 種 PspMan4 マンナーゼ変異体 PspMan138 を生じさせる DNA 操作を、従来の分子生物学技術を用いて実行した (例えば、Sambrook et al, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* 参照)。野生型パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属種 PspMan4 マンナーゼの配列中に複数のアミノ酸改変を導入した人工 DNA 配列を生じさせた。当該野生型マンナーゼは、2015年7月10日出願の国際出願 PCT/US15/40057号明細書 (後に国際公開第2016/007929号パンフレットとして公開) 中により完全に記載されている。

【0235】

PspMan138 遺伝子のヌクレオチド配列を、配列番号1 (予測される天然のシグナルペプチドをコードする配列を含む) として示す。

【0236】

枯草菌 (*B. subtilis*) aprE プロモーター (配列番号2) 及び枯草菌 (*B. subtilis*) aprE シグナルペプチド (配列番号3) を含む DNA カセットを合成した。当該技術分野において知られている技術を用いて、PCR断片を、Gibson Assembly を用いてアセンブルして、最終の発現カセットを作製した。配列番号3によってコードされる枯草菌 (*B. subtilis*) 由来の aprE シグナルペプチドのアミノ酸配列を、配列番号4として示す。

【0237】

PspMan138 遺伝子及び先で記載した他の要素を組み込んだ発現カセットを、pHYT複製シャトルベクター中にクローニングして、適切な枯草菌 (*B. subtilis*) 株中に形質転換した。BstEII部位及びEcoRI部位 (配列番号5) を用いてテトラサイクリン耐性遺伝子の後ろにターミネーターを付加することによって、pHYTベクターをpHY300PLK (タカラバイオ株式会社) から得た。また、BamHI部位及びHindIII部位 (配列番号6) 中にクローニングしたリンカーを用いて、pHY300PLK中のHindIII部位を除去した。

【0238】

表1に一覧にするプライマー (配列番号8~11) を用いるPCRによって、枯草菌 (*B. subtilis*) 発現カセット (配列番号7) 及びPspMan138 遺伝子 (配列番号1) を含むDNAフラグメントを増幅した。

【0239】

枯草菌 (*B. subtilis*) 発現カセット用の核酸配列を、配列番号7として示す：

【0240】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 1: PspMan138 枯草菌( <i>B. subtilis</i> )発現カセットを構築するのに用いたプライマー		
プライマー	配列	配列番号
oMCS715	G TTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCT	8
oMCS717	G GGCCAAGGCCGGTTTTTTATGTATTA	9
oMCS718	T AATACATAAAAAACCGGCCCTTGGCCCC	10
oMCS719	A GCCTGCGCAGACATGTTGCTGAAC	11

10

## 【0241】

当該技術分野において知られている技術を用いて、Gibson Assembly (SGI DNA Cat# GA1100-10)を用いてPCR断片をアセンブルして、最終発現カセットを作製した。枯草菌(*B. subtilis*)細胞を形質転換して、5 µg/ml クロラムフェニコールを補った、アガーで固めたLB上で増殖させた。

## 【0242】

PspMan138 遺伝子によってコードされるPspMan138前駆体タンパク質のアミノ酸配列を、配列番号12として示す。成熟した酵素、PspMan138(298アミノ酸)のアミノ酸配列を、配列番号13として示す。

## 【0243】

20

## 実施例 2

マンナーゼの活性及び安定性を特徴付ける方法

生化学的特徴付け用にPspMan4(成熟したタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号14として示す)及びPspMan138変異体(配列番号13)の酵素サンプルを作製するために、形質転換した枯草菌(*B. subtilis*)細胞の選択的増殖を、96ウェルマイクロタイタープレート(MTP)中で37にて68時間、各ウェル内の培地(主要な窒素源としての尿素、主要な炭素源としてのグルコースを有し、ロバストな細胞増殖のために1%ソイトンを補った、MOPSバッファに基づく半規定富化培地)中で実行した。培養物を、3600rpmにて45分間の遠心分離によって収穫して、Multiscreen(登録商標)フィルタプレート(EMD Millipore, Billerica, MA, USA)により、Millipore真空系を用いて濾過した。濾過した培養液の上澄みを、以下に記載するアッセイに用いた。

30

## 【0244】

マンナーゼ活性アッセイ

PspMan4及びそのPspMan138変異体のマンナーゼ活性を、溶液中ローストビーンガム(LBG)ガラクトマンナンの加水分解を測定することによって試験した。用いた基質は、50mMトリスHClバッファ、pH7.5(基質希釈バッファ)中0.28%(w/v) LBG溶液であった。作用基質溶液を調製するために、LBG粉末(製品No. G0753, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を、50mMトリスHClバッファ、pH7.5の加熱溶液中に攪拌下で溶解させた。室温に冷却して直ぐに、溶液を遠心分離して、澄明な上澄みを基質溶液として用いた。酵素サンプルを、酵素希釈バッファ(50mM MOPSバッファ、pH7.2、0.005% Tween(登録商標)-80含有)中に希釈して、希釈した酵素溶液のアリコート、LBG基質溶液を含有する平底クリアポリスチレンMTPに加えた。プレートをシールして、900rpmでの攪拌(例えばiEMSインキュベーター/シェーカー、Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)により40にて10分間、インキュベートした。インキュベーションの後、放出された還元糖を、BCA試薬アッセイ(カタログNo. 23225、Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL)を用いて定量化した。詳細には、LBGアッセイプレートの各ウェル由来のアリコートを、BCA作用試薬溶液(メーカーの説明書に従って調製した

40

50

を含有するPCRプレートに加えた；サンプル対作用試薬の比は、1：9（v/v）であった。プレートをシールして、サーモサイクラー（例えばTetrad 2 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA）内で95℃にて2～3分間インキュベートした。プレートを30℃に冷却した後、反応溶液を、フレッシュな平底クリアポリスチレンMTP（例えばCostar 9017）に移して、吸光度をプレートリーダー分光光度計（例えばSpectraMax Plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA）内で562nmにて測定した。マンナーゼを含有しないサンプル（ブランク）の吸光度の値を、マンナーゼ含有サンプルの吸光度の値から減算した。生じた吸光度を、マンナーゼ活性の尺度とした。

10

【0245】

安定性アッセイ

PspMan4及びそのPspMan138変異体の安定性を、ストレス条件下で、市販のTIDE（登録商標）液体洗濯洗剤（Original scent, Procter and Gamble、2014年に一地方のスーパーマーケットで購入して、以下の実施例4に記載するプロトコルを用いて熱不活化した）の10%（v/v）水溶液中で、高温（56℃）にて5分間インキュベーションした後のサンプルの残留活性を測定することによって、試験した。

【0246】

熱不活化洗剤の12.5%（v/v）水溶液を調製して、濾過した培養液の上澄み由来の酵素サンプルを、この洗剤溶液の、10%（v/v）の最終洗剤濃度を達成するのに適切な容量と混合した。初期の（ストレスのない）活性を測定するために、先に記載した「マンナーゼ活性アッセイ」を用いて、この混合物のアリコートを直ちに、50mM MOPSバッファ、pH7.2、0.005%TWEEN（登録商標）-80中に希釈して、LBGに対する活性についてアッセイした。ストレスを受けた活性を測定するために、先の「マンナーゼ活性アッセイ」に記載したように、洗剤溶液と混合した酵素サンプルを、シールしたPCRプレート内で、サーモサイクラー（Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA）において56℃にて5分間インキュベートしてから、50mM MOPSバッファ、pH7.2、0.005%TWEEN（登録商標）-80中に希釈して、活性

20

30

【0247】

先に記載したように、ストレスを受けた活性の値及びストレスのない活性の値を、LBG基質の加水分解によって一旦測定して、ストレスを受けた活性の、ストレスのない活性に対する比率をとって、100を乗じることによって、%残留活性を算出した。結果を表2に要約する。PspMan138が、TIDE（登録商標）液体洗濯洗剤におけるこの温度ストレス試験の後も、酵素活性を保持したことが示される。

【0248】

【表4】

40

表 2: 10% TIDE®液体洗濯洗剤中 56℃での PspMan4 親マンナーゼと PspMan138 変異体マンナーゼの安定性比較	
マンナーゼ	%残留活性
PspMan4	10%
PspMan138	60%

【0249】

実施例 3

マンナーゼの洗浄性能

マンナーゼ酵素を、MESバッファpH5.3中での硫酸アンモニウム沈殿によって

50



清澄化したバチルス (*Bacillus*) 属培養液の上澄みから単離した。精製を、疎水性交換クロマトグラフィに続く、50 mM MESバッファ、pH 6.0中への透析によって達成した。次に、プロピレングリコールを加えて40%の最終濃度にして、サンプルを、更なる特徴付けまで冷蔵保存した。

#### 【0250】

PspMan138及び市販のマンナーゼ (MANNAWAY (登録商標) 4 L, Novozymes AS, Denmark) の洗い性能を、洗濯洗剤用途において、Terg-o-tometerを用いて試験した。性能評価を16にて行った。汚れ負荷 (soil load) は、1 Lの脱イオン水で満たしたterg-o-tometerピーカーにおいて、2つのCFT C-S-73ローカストピーニングガム (LBG) のスイッチ (Center for Testmaterials BV, Vlaardingen, Netherlands) からなつた。水硬度を100 ppm (3:1 Ca:Mg) に調整し、pHを、5 mM HEPESを用いて8.2に調整した。熱で不活化したTide (登録商標) Liquid Laundry Detergent (Original scent, 2014年に一地方のスーパーマーケットで購入した) を、ピーカーに1 g / lにて加えた。熱不活化プロトコルを、以下で実施例4に記載する。各マンナーゼを、ピーカーに種々の用量にて、15分の洗い用に加えた。洗い処理の後、スイッチを遠心乾燥させてから、空気乾燥させた。

10

#### 【0251】

各スイッチを、色彩計 (Konica Minolta Chroma Meter CR-410, 50 mmの口径) を用いて、処理の前後に測定した。L、a、b値の差異を、CIE-LAB色空間によって定義される総色差 (dE) に変換した。これらの値を用いて、スイッチの洗浄レベルを判定して、結果をパーセント染み除去 (%SRI) として表した。PspMan138及びMANNAWAY (登録商標) 4 LによるCS-73スイッチの洗浄結果を、図1に示す。この洗浄アッセイにおいて、PspMan138及びMANNAWAY (登録商標) 4 Lは、LBGの汚れに対して、匹敵する染み除去を示した。

20

#### 【0252】

##### 実施例4

市販の液体洗濯洗剤中でのマンナーゼの半減期の判定

30

市販の洗剤の不活化

本明細書中で以下に示す表3に一覧にする液体洗濯洗剤を、一地方のスーパーマーケットで購入した。バックグラウンド酵素活性を無効にするために、これらの市販の洗剤中に存在する酵素を、洗剤を95にて3~4時間の加熱することによって、不活化した。加熱後、洗剤を、本明細書中で以下に示すプロテアーゼ及びアミラーゼ活性アッセイを介して、酵素活性についてアッセイした。洗剤を4時間加熱した後、プロテアーゼ及びアミラーゼ活性は、検出されなかった。さらに、熱不活化洗剤中のマンナーゼ活性の不在が、以下の「残留マンナーゼ活性アッセイ」中で記載するLBG基質に対する活性アッセイによって示された。

#### 【0253】

40

【表 5】

洗剤名	メーカー	購入国
Brilux Super Concentrado	Raymundo da Fonte, S.A.	ブラジル
Total Effect Care	Guangzhou Liby Enterprise Group Co., Ltd.	中国
Baby Laundry Detergent	Guangzhou Blue Moon Industry Co., Ltd.	中国
Arm & Hammer plus Oxiclean	Church and Dwight Co., Inc.	米国
Kirkland Signature Ultra Clean	自社ブランド	米国
Persil Power Gel	Henkel AG & Co, KGaA	オランダ
Ist de Beste	自社ブランド	オランダ
Epsil Perfect	自社ブランド	仏国

## 【0254】

市販の液体洗濯洗剤中のプロテアーゼ及びアミラーゼ活性アッセイ

最初に洗剤を 50 mM MOPS バッファ、pH 7.2 中に 1 : 5 で希釈することによって、酵素活性を測定した。

## 【0255】

プロテアーゼアッセイ：プロテアーゼ活性を、pH 8.6 のバッファ、25 にて、スクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリル-L-フェニル-p-ニトロアニリド基質 (suc-AAPF-pNA, Sigma: S-7388) を用いて測定した。用いた試薬溶液は、以下の通りであった：100 mM トリス/HCl、pH 8.6、0.005% TWEEN (登録商標) - 80 含有 (トリス希釈バッファ)；100 mM トリスバッファ、pH 8.6、10 mM CaCl<sub>2</sub> 及び 0.005% TWEEN (登録商標) - 80 (トリス/Ca バッファ) 含有；並びに DMSO (suc-AAPF-pNA ストック溶液) (Sigma: S-7388) 中 160 mM suc-AAPF-pNA。150 µl トリス希釈バッファを含有する各ウェルに 10 µl の希釈洗剤を加えてから直ぐ後に、100 µl の 2 mg/ml suc-AAPF-pNA 作用溶液を 25 にて加えることによって、アッセイを実行した。反応を、市販の非加熱洗濯洗剤に対して視覚的に評価した。ここでは、色の生成が酵素活性を示す。

## 【0256】

アミラーゼアッセイ：Ceralpha HR キット (Megazyme, Wicklow, Ireland) を用いて、Ceralpha アルファ-アミラーゼアッセイを実行した。用いた基質は、規定オリゴサッカライド「非還元末端ブロック p-ニトロフェニルマルトヘプタオシド (BP-NPG7)、及び過剰レベルのアルファ-グルコシダーゼ (「阻止基」の存在に起因して、固有の基質に対する活性がない) の混合物であった。反応を開始させるために、希釈した市販の洗剤を、50 mM MOPS バッファ、pH 7.2、25 中の基質に加えた。反応を、市販の非加熱洗濯洗剤に対して視覚的に評価した。ここでは、色の生成が酵素活性を示す。

## 【0257】

PspMan138 及び市販のマナーゼ (MANNAWAY (登録商標) 4 L, Novozymes AS, Denmark) サンプルを、表 3 に一覧にした熱不活化洗剤に、0.3% (w/w) の最終濃度となるように加えた。マナーゼに加えて、プロテアーゼ BPN'-Y217L サブチリシンを洗剤に 3.0% (w/w) にて加えた。マナーゼ及びプロテアーゼサンプルを含有する洗剤を、37 に置いた。アリコート種々の時点 (0 ~ 28 日目) で取り出して、凍結させた。全てのサンプルの残留マナーゼ活性を、下記のようにアッセイした。

## 【0258】

10

20

30

40

50

### 残留マンナーゼ活性アッセイ

マンナーゼの - 1, 4 - マンナーゼ活性を、放出された還元糖を定量化することによって測定した。用いた基質は、0.28% LBGガラクトマンナン (Sigma G0753) であった。放出された糖を、還元糖と反応するジニトロサリチル酸 (DNS) を用いて定量化した；その540 nmでの吸光度は、酵素活性と比例する。

#### 【0259】

作用基質溶液 (50 mM トリス HCl バッファ、pH 7.5 中 2.8 g/l LBG、実施例 2 に記載したようにして調製) の 0.4 mL アリコートをし、水バス中で 40 °C にて 10 分間プレ平衡させることによって、アッセイを実行した。プレ平衡基質溶液中への 0.1 mL の 1.9 ppm マンナーゼ溶液の付加によって反応を開始させて、混合して、40 °C にて 15 分間インキュベートした。反応は、0.6 mL の 3, 5 - ジニトロサリチル酸試薬 (43.8 mM 3, 5 - ジニトロサリチル酸、400 mM 水酸化ナトリウム、1.06 M 酒石酸カリウムナトリウム四水和物) の付加によって終了した。反応管を、100 °C の水バス内に 15 分間置いてから、氷バス上で 5 分間冷却して、室温にて 10 分間さらに平衡させた。吸光度を、540 nm にて測定して、LBG ガラクトマンナンに対する相対酵素活性を判定した。

#### 【0260】

次に、各マンナーゼについての残留マンナーゼ活性データを、1 フェーズ指数関数的減衰モデルを用いてフィットさせた。これらのデータから半減期 (日) を判定して、表 4 に示す。半減期は、元のマンナーゼ活性の 50% が観察される時期である。PspMan138 の半減期は、プロテアーゼの存在下で、市販の液体洗濯洗剤中の MANNAWAY (登録商標) 4 L (表 4 において「ベンチマーク」と呼ぶ) よりも向上している。

#### 【0261】

#### 【表 6】

洗剤名	半減期 (日)	
	PspMan138	ベンチマーク
Brilux Super Concentrado	26	5
Total effect care	40	6
Baby Laundry Detergent	20	4
Arm and Hammer plus Oxiclean	22	8
Kirkland Signature Ultra Clean	29	3
Persil Power Gel	21	18
1st de Beste	16	3
Epsil Perfect	16	10

#### 【0262】

#### 実施例 5

#### 相同マンナーゼの同定

関連タンパク質を、PspMan138 の成熟したアミノ酸配列 (配列番号 13) を用いて、NCBI 非重複タンパク質データベースに対する BLAST 検索 (Altschul et al., Nucleic Acids Res, 25:3389-402, 1997) によって同定した。サブセットを表 5 A に示す。類似した検索を、Genome Quest Patent データベースに対してランした。検索パラメータは、PspMan138 の成熟したタンパク質アミノ酸配列 (配列番号 13) をクエリ配列として用いるデフォルト値に設定した。サブセットを表 5 B に示す。

#### 【0263】

同一残基の数を、ペアワイズアラインメントにおいてアラインした残基の数で割ることによって、双方の検索セットについてのパーセント同一性（PID）を定義する。「アラインメント長」の名称の欄は、一覧にした受託No.と関連するタンパク質配列の長さ（アミノ酸）を指す一方、「配列長」の名称の欄は、PID計算に用いた、アラインしたタンパク質配列の長さ（アミノ酸）を指す。

【 0 2 6 4 】

【表 7】

表 5A: NCBI 非重複タンパク質データベースから同定した、PspMan138 に対するパーセント同一性を示す配列のリスト

受託#	PID	生物	配列長	アラインメント長
ACU30843	93.9	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 A1	319	297
WP_036670707/ ETT37549/ WP_036608478	93.9	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 VT-400/パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 FSL R5-192/パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> ) 属種 FSL H7-689	326	296
WP_017688745	93.6	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 PAMC 26794	326	296
WP_053782127	91.6	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 A59	326	296
WP_024633848	90.9	パエニバチルス ( <i>Paenibacillus</i> ) 属種 MAEPLYI	326	296
AAX87003	89.9	バチルス・サーキュランス( <i>Bacillus circulans</i> )	326	296
WP_046227931	86.5	パエニバチルス・ダウシ( <i>Paenibacillus dauci</i> )	327	296
WP_017813111	86.5	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 A9	327	296
ΔEX60762	86.5	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 CH-3	327	296
WP_046214462	85.8	パエニバチルス・ウルムキエンシス ( <i>Paenibacillus wulumuqiensis</i> )	327	296
WP_039270469	79.4	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	327	296
WP_053324578	79.4	パエニバチルス・ペオリアエ ( <i>Paenibacillus peoriae</i> )	327	296
WP_029515900	79.4	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	327	296
WP_013308634/ YP_003868989	79.4	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> ) E681	327	296
WP_025719962	79.1	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	327	296
WP_028541088	79.1	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 UNCCL52	327	296
WP_023986875	79.1	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> ) CR1	327	296
WP_016819573	78.7	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	327	296
WP_025675579	78.7	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	327	296
WP_019686064	78.7	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	327	296
WP_017427981	78.4	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 ICGEB2008	327	296
WP_031462818	78.4	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	327	296
WP_025363950	78.4	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	327	296

【 0 2 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 5A: NCBI 非重複タンパク質データベースから同定した、PspMan138 に対するパーセント同一性を示す配列のリスト				
WP_013369280/ YP_003944884	78.4	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> ) M1	327	296
AAX87002	77.7	バチルス・サーキュランス( <i>Bacillus circulans</i> )	327	296
WP_036672952	77.4	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 HGF5	327	296
EGG34454	77.4	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 HGF5	326	296
WP_036660823	76.7	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 FSL H8-457	327	296
ETT67091	76.7	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 FSL H8-457	326	296
BAA25878	70.0	バチルス・サーキュランス( <i>Bacillus circulans</i> )	516	297
WP_038693099	69.4	パエニバチルス・ステリファ( <i>Paenibacillus stellifer</i> )	485	297
WP_054941173	69.4	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 GD6	489	297
WP_046502059	67.4	パエニバチルス・リオグランデンシス ( <i>Paenibacillus riograndensis</i> ) SBR5	554	288
WP_038572364	67.4	パエニバチルス・オドリファ( <i>Paenibacillus odorifer</i> )	573	288
WP_020430769	67.4	パエニバチルス・リオグランデンシス ( <i>Paenibacillus riograndensis</i> )	554	288
WP_036685784	67.0	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 FSL H8-237	555	288
WP_042266414	67.0	パエニバチルス・グラミニス( <i>Paenibacillus graminis</i> )	536	288
WP_028597898	66.6	パエニバチルス・パサデネンシス ( <i>Paenibacillus pasadenensis</i> )	328	299
WP_039838655	66.3	パエニバチルス・ソンチ( <i>Paenibacillus sonchi</i> )	550	288
WP_014651264/ YP_006190599	65.5	パエニバチルス・ムシラギノサス( <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> ) K02	475	296
WP_014370462	65.5	パエニバチルス・ムシラギノサス( <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> ) 3016	518	296
WP_041617099	65.2	パエニバチルス・ムシラギノサス( <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> )	475	296
AEI42807	65.1	パエニバチルス・ムシラギノサス( <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> ) KNP414	437	292
WP_019912481	65.0	パエニバチルス( <i>Paenibacillus</i> )属種 HW567	547	294

【 0 2 6 6 】

10

20

30

40

50

【表 9】

Table 5B: Genome Quest データベースから同定した、PspMan138 に対するパーセント同一性を示す配列のリスト				
特許ID #	PID	生物	配列長	アラインメント長
EP2260105-0418	89.9	バチルス・サーキュランス ( <i>Bacillus circulans</i> )	326	296
EP2260105-0427	77.7	バチルス・サーキュランス ( <i>Bacillus circulans</i> )	327	296
CN100410380-0003	77.7	バチルス・サーキュランス ( <i>Bacillus circulans</i> ) B48	296	296
CN1904052-0003	77.0	バチルス・サーキュランス ( <i>Bacillus circulans</i> ) B48	327	296
US20090325240-0477	70.0	バチルス・サーキュランス ( <i>Bacillus circulans</i> )	516	297
US20140199705-0388	65.3	無し	490	291
WO2014100018-0002	64.3	バチルス・レントス( <i>Bacillus lentus</i> )	299	297
WO2015022428-0015	60.5	バチルス( <i>Bacillus</i> )属種	309	290
EP2260105-0429	60.5	バチルス( <i>Bacillus</i> )属種 JAMB-602	490	296
WO2014088940-0011	60.3	B.ヘミセルロシライティカス ( <i>B. hemicellulosilyticus</i> ) 合成物	464	297
US6566114-0008	60.3	バチルス・アガラドヘレンス ( <i>Bacillus agaradhaerens</i> )	468	297
US6566114-0004	60.1	バチルス( <i>Bacillus</i> )属種	476	296
US6566114-0002	60.1	バチルス( <i>Bacillus</i> )属種	490	296

【 0 2 6 7 】

相同配列のアラインメント

P s p M a n 1 3 8 ( 配列番号 1 3 ) 及び親 P s p M a n 4 ( 配列番号 1 4 ) を含む N D L - クレドマンナーゼについての成熟したタンパク質アミノ酸配列の、 B c i M a n 1 \_ B A A 2 5 8 7 8 . 1 ( 配列番号 4 0 ) 、 バチルス ( B a c . ) 属種 \_ B A D 9 9 5 2 7 . 1 ( 配列番号 4 3 ) 、 B . ネアルソニイ ( B \_ n e a l s o n i i ) \_ A G U 7 1 4 6 6 . 1 ( 配列番号 4 2 ) 、 バチルス ( B a c . ) 属種 \_ W O 2 0 1 5 0 2 2 4 2 8 - 0 0 1 5 ( 配列番号 4 4 ) 、 B . レントス ( B . l e n t u s ) \_ W O 2 0 1 4 1 0 0 0 1 8 - 0 0 0 2 ( 配列番号 4 1 ) 、 U S 6 5 6 6 1 1 4 - 0 0 2 ( 配列番号 1 6 0 ) 、 並びに P a m M a n 2 、 P a m M a n 3 、 P t u M a n 2 、 P p a M a n 2 、 及び P s p M a n 9 ( これらは、 2 0 1 5 年 7 月 1 0 日 出 願 の 国 際 特 許 出 願 P C T / U S 1 5 / 4 0 0 5 7 号 明 細 書 ( 後 に 国 際 公 開 第 2 0 1 6 / 0 0 7 9 2 9 号 パ ン フ レ ッ ト と し て 公 開 ) に お いて より 完 全 に 記 載 さ れ て い る ) の 成 熟 し た 形 態 を 含 む 他 の マ ン ナ ー ゼ の 成 熟 し た タ ン パ ク 質 ア ミ ノ 酸 配 列 と の ア ラ イ ン メ ン ト を、 図 2 に 示 す。 配 列 を、 G e n e i o u s ソ フ ト ウ ェ ア ( B i o m a t t e r s L t d . ) の M U S C L E プ ロ グ ラ ム ( R o b e r t C . E d g a r . M U S C L E : m u l t i p l e s e q u e n c e a l i g n m e n t w i t h h i g h a c c u r a c y a n d h i g h t h r o u g h p u t N u c l . A c i d s R e s . ( 2 0 0 4 ) 3 2 ( 5 ) : 1 7 9 2 - 1 7 9 7 ) を 用 い て、 デ フ ォ ル ト の パ ラ メ ー タ で ア ラ イ ン し た。 図 2 の 種 々 の マ ン ナ ー ゼ の 成 熟 し た 形 態 の ア ミ ノ 酸 配 列 に つ い て の 系 統 樹 を、 G e n e i o u s T r e e ビ ル ダ ー プ ロ グ ラ ム を 用 い て 構 築 し て、 図 3 に 表 す。

【 0 2 6 8 】

実施例 6

P s p M a n 1 3 8 マ ン ナ ー ゼ の 特 有 の 特 徴

P s p M a n 1 3 8 ( 配列番号 1 3 ) 及び親 P s p M a n 4 ( 配列番号 1 4 ) のアミノ酸配列を、CLUSTALWソフトウェア(Thompson et al., Nucleic Acids Research, 22: 4673 - 4680, 1994)を用いて、デフォルトのパラメータでアラインして、図2に示した。アラインメントは、P s p M a n 1 3 8 及び P s p M a n 4 が、残基 T r p 3 1 から I l e 4 0 まで延びるモチーフを共有していることを示した。ポリペプチドのアミノ酸位置は、配列番号 1 4 に示すアミノ配列との対応によって番号を付けている。NDLマンナーゼは、クレード(以降NDL-Cladeと呼ぶ)を生じさせる特徴を共有しており、用語NDLは、N末端近くの保存された残基NDL(A s n 3 4 - A s p 3 5 - L e u 3 6)に由来する。このモチーフを、 $W X_a K N D L X X A I$  (配列番号 1 5) と記載することができ、式中、 $X_a$  は、F 又は Y であり、X は、あらゆるアミノ酸である(「モチーフ1」)。当該モチーフは、2015年7月10日出願の国際特許出願PCT/US15/40057号明細書(後に国際公開第2016/007929号パンフレットとして公開)においてより完全に記載されている。

10

#### 【0269】

NDL-Cladeのメンバーはまた、保存されたモチーフを、バチルス(Bacillus)属種JAMB-602\_BAD99527.1(Akita et al(2004)Acta Cryst. D60: 1490 - 1492)、並びに他の基準マンナーゼ配列、例えば、B.ネアルソニイ(B\_\_nealsonii)\_\_AGU71466.1及びBciman1\_\_B.サーキュランス(B\_\_circulans)\_\_BAA25878.1に存在しない欠失の重要な特徴と共に共有する(以降「欠失モチーフ」)。欠失モチーフは、残基L e u 2 6 3 - A s p 2 6 4 (L D) から L e u 2 7 3 - T h r 2 7 4 (L T) の間に出現し、ポリペプチドのアミノ酸位置は、配列番号 1 4 に示すアミノ配列との対応によって番号を付けており、そして以下の配列を含む:  $L D X X X G P X G X L T$  (配列番号 1 6) (式中、X は、あらゆるアミノ酸である)(「欠失モチーフ1」);  $L D X_1 V / A T / A G P X_2 G X_3 L T$  (配列番号 1 7) (式中、 $X_1$  は、L 又は M であり、 $X_2$  は、N、A、又は S であり、 $X_3$  は、S、T、又は N である)(「欠失モチーフ2」); 又は  $L D M / L A T G P N / A G S / T L T$  (配列番号 1 8) (「欠失モチーフ3」)。欠失モチーフは、2015年7月10日出願の国際特許出願PCT/US15/40057号明細書(後に国際公開第2016/007929号パンフレットとして公開)においてより完全に記載されている。

20

30

#### 【0270】

##### 実施例7

付加的なバチルス(Paenibacillus)属種P s p M a n 4 変異体のクローニング及び発現

付加的なバチルス(Paenibacillus)属種P s p M a n 4 変異体を生じさせるDNA操作を、実施例1に記載するようにして、表1に一覧にしたプライマーで実行した。親P s p M a n 4 (配列番号14)に対して配列置換が生じたP s p M a n 4 変異体のリストを、表6に示す。成熟したP s p M a n 4 変異体のアミノ酸配列: P s p M a n 1 1 5 ~ 1 2 2、P s p M a n 1 2 4 ~ 1 3 0、P s p M a n 1 3 2 ~ 1 4 5、P s p M a n 1 4 8、P s p M a n 1 5 0 ~ 1 5 8、P s p M a n 6 1 5 3、P s p M a n 6 4 2 8、P s p M a n 6 4 3 5、P s p M a n 6 5 7 4、P s p M a n 6 6 6 8、P s p M a n 6 6 7 0、P s p M a n 6 7 2 2、P s p M a n 7 1 5 4、P s p M a n \_\_H M 4 8 ~ 6 4、P s p M a n \_\_H M 6 6 ~ 6 7、及びP s p M a n \_\_H M 7 1 を、配列番号46~91、141~159、及び161に示す。

40

#### 【0271】

50

【表 10】

表 6: PspMan4 親に対する配列置換を有する PspMan4 変異体		
配列番号	マンナナーゼ	PspMan4 親に対する配列置換
14	PspMan4	無し
46	PspMan115	P19E-T38E-K63L-N71D-Y129M-Q184L-K244L-S258D-N261R
47	PspMan116	N67D-Y129M-P168S-Q184L-K244L-S258D-G259P
48	PspMan117	P19E-K63L-N67D-Q78D-K80T-N97D-Y129M-G225C-T228V-K244L
49	PspMan118	P19E-T38E-N67D-N97D-Y129M-P168S-Q184L-K244L-S258D-N261R
50	PspMan119	P19E-T38E-N67D-N71D-Q78D-K80T-N97D-Y129M-P168S-G225C-K244L-S258D-N261R
51	PspMan120	T38E-K63L-N71D-N97D-Y129M-Q184L-G225C-T228V-Q242L-K244L-S258D-N261R
52	PspMan121	P19E-K63L-N71D-N97D-Y129M-Q184L-G225C-K244L-S258D-G259P
53	PspMan122	N10T-T38E-S59V-L60Q-K63R-L66V-A68S-N74S-V75L-N97D-V103I-Y129M-F167Y-Q184L-A217P-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
54	PspMan124	P19E-T38E-N67D-N71D-N97D-Y129M-F167Y-Q184L-A217P-K244L-S258D-N261R
55	PspMan125	T38E-K63L-N67D-Q78D-K80T-N97D-Y129M-P168S-Q184L-K244L-S258D-N261R
56	PspMan126	P19E-T38E-N67D-Y129M-P168S-Q184L-K244L-S258D-N261R
57	PspMan127	P19E-N67D-N97D-Y129M-P168S-Q184L-K244L
58	PspMan128	P19E-T38E-K63L-N71D-Y129M-P168S-G225C-T228V-K244L-S258D-N261R
59	PspMan129	P19E-T38E-N67D-N97D-Q184L-A217P-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R
60	PspMan130	N10T-P19E-G28S-S30T-T38E-N67D-N71D-N97D-Y129M-P168S-Q184L-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
61	PspMan132	P19E-T38E-S59V-L60Q-K63R-N67D-N97D-V103I-Y129M-K143Q-F167Y-Q184L-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
62	PspMan133	P19E-T38E-N67D-N71D-Q78D-K80T-N97D-Y129M-P168S-G225C-T228V-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
63	PspMan134	P19E-T38E-S59V-L60Q-K63L-K70R-N71D-Q78D-K80T-N97D-E111D-Y129M-Q184L-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
64	PspMan135	N10T-T38E-K63L-N71D-N97D-V103I-Y129M-F167Y-Q184L-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
65	PspMan136	N10T-P19E-T38E-N67D-Q78D-K80T-N97D-Y129M-K143Q-Q184L-A217P-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
66	PspMan137	N10T-P19E-T38E-S59V-L60Q-K63L-N97D-V103I-Y129M-F167Y-Q184L-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
13	PspMan138	P19E-S30T-T38E-S59V-L60Q-K63R-N67D-N97D-V103I-Y129M-F167Y-Q184L-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q

10

20

30

40

【0272】

50



## 【表 1 1】

表 6: PspMan4 親に対する配列置換を有する PspMan4 変異体		
配列番号	マンナナーゼ	PspMan4 親に対する配列置換
67	PspMan139	P19E-S30T-T38E-S59V-L60Q-K63R-N67D-Q78D-K80T-N97D-I124V-Y129M-K143Q-F167Y-Q184L-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
68	PspMan140	N10S-P19E-S30T-T38E-S59V-L60Q-K63L-N67D-Q78H-K80T-I82M-N97D-Y129M-K143Q-F167Y-Q184L-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
69	PspMan141	N10T-P19E-S30T-T38E-S59V-L60Q-K63R-N67D-N97D-Y129M-K143Q-P168S-Q184L-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
70	PspMan142	G4S-N10T-P19E-T38E-N67D-Q78D-K80T-N97D-Y129M-Q184L-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
71	PspMan143	N10T-P19E-S30T-T38E-S59V-L60Q-K63I-K70R-N71D-Q78D-K80T-N97D-Y129M-T131A-F167Y-Q184L-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
72	PspMan144	N10T-P19E-S30T-T38E-S59V-L60Q-K63L-K70R-N71D-Q78D-K80T-N97D-E111D-Y129M-P168S-Q184L-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
73	PspMan145	P19E-S30T-T38E-S59V-L60Q-K63R-N67D-N97D-Y129M-P168S-Q184L-K214I-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
74	PspMan148	N10T-P19E-S30T-T38E-S59V-L60Q-K63R-N67D-N97D-Y129M-K143Q-P168S-Q184L-G225P-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
75	PspMan150	M1V-P19E-S30T-T38E-T62E-N67D-N71D-Q78D-N97D-Y129M-K143R-F167Y-P168S-Q184L-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-T284A-Z298.01Q
76	PspMan151	Y6E-N10T-P19E-G28S-S30T-T38E-K63L-N67D-N71D-N97D-E111S-Y129M-S135I-P168S-Q184L-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261Q-D283S-Z298.01Q
77	PspMan152	N10T-P19E-S30T-T38E-S59V-L60Q-K63R-N67D-N71D-N97D-V103I-Y129M-K143Q-P168S-Q184L-G225P-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
78	PspMan153	A2S-P19E-G28S-S30T-T38E-K63R-N67D-N71D-N74E-K93R-N97D-Y129M-N150T-P168S-Q184L-N213A-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261Q-Z298.01Q
79	PspMan154	M1L-N10T-P19E-G28A-S30T-T38E-K63L-N67D-N71D-Q78D-N97D-Y129M-A136L-P168A-Q184L-N213A-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
80	PspMan155	P19E-T38E-S59V-K63R-N67D-N97D-V103I-Y129M-F167Y-Q184L-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
81	PspMan156	N10T-P19E-G28A-S30T-T38E-K63R-N67D-N97D-Y129M-Q184L-G225C-T228V-Y235L-K244L-S258D-N261R-Z298.01Q
82	PspMan157	T3R-N10T-P19E-G28A-S30T-T38E-T62E-N67D-N71D-K93R-N97L-E111S-Y129M-D139M-P168S-Q184L-G225C-Y235L-K244L-S258D-N261Q-Z298.01Q

10

20

30

40

## 【 0 2 7 3 】

【表 1 2】

表 6: PspMan4 親に対する配列置換を有する PspMan4 変異体		
配列番号	マンナーゼ	PspMan4 親に対する配列置換
83	PspMan158	N10T-P19E-G28A-S30T-T38E-S59D-N67D-A68S-N71D-K93R-N97D-Y129M-K143Q-P168S-Q184D-G225C-Y235L-K244I-S258D-N261R-T284E-Z298.01Q
84	PspMan6153	P19E-K63L-N71D-Y129M-P168S-Q184L-G225C-K244L-G259R
85	PspMan6428	P19E-N67D-N71D-Q78D-K80T-N97D-Y129M-P168S-Q184L-K244L
86	PspMan6435	P19E-T38E-N67D-Y129M-P168S-Q184L-T228V-K244L
87	PspMan6574	P19E-T38E-N67D-Y129M-Q184L-K244L-S258D-N261R
88	PspMan6668	P19E-K63L-N71D-Y129M-P168S-Q184L-K244L-S258D-N261R
89	PspMan6670	P19E-T38E-K63L-N71D-Y129M-P168S-Q184L-K244L-S258D-G259P
90	PspMan6722	K63L-N71D-Y129M-K143R-P168S-Q184L-G225C-T228V-K244L-S258D-G259P
91	PspMan7154	P19E-T38E-K63L-N71D-Y129M-P168S-Q184L-K244L-S258D-N261R
141	PspMan_HM48	Y129M-K244L
142	PspMan_HM49	Y129M-K143Q-K244L
143	PspMan_HM50	T38E-S258D
144	PspMan_HM51	T38E-K143Q-S258D
145	PspMan_HM52	P19E-Q184D
146	PspMan_HM53	P19E-K143Q-Q184D
147	PspMan_HM54	P19E-Q184L
148	PspMan_HM55	P19E-K143Q-Q184L
149	PspMan_HM56	N97D-G225C
150	PspMan_HM57	N97D-K143Q-G225C
151	PspMan_HM58	N97D-G225P
152	PspMan_HM59	N97D-K143Q-G225P
153	PspMan_HM60	N67D-P168S
154	PspMan_HM61	N67D-K143Q-P168S
155	PspMan_HM62	K63L-N71D
156	PspMan_HM63	K63L-N71D-K143Q
157	PspMan_HM64	K63R-N71D
158	PspMan_HM66	T228V-Y235L
159	PspMan_HM67	K143Q-T228V-Y235L
161	PspMan_HM71	L60Q-Y61W

## 【0274】

PspMan4 変異体の固有のシグナルペプチドについての核酸配列を、配列番号 92 として示す。成熟した PspMan4 変異体をコードする遺伝子のヌクレオチド配列: PspMan115~122、PspMan124~130、PspMan132~145、PspMan148、PspMan150~158、PspMan6153、PspMan6428、PspMan6435、PspMan6574、PspMan6668、PspMan6670、PspMan6722、及び PspMan7154 を、配列番号 93~139 に示す。PspMan4 変異体のシグナルペプチドのアミノ酸配列を、配列番号 140 として示す。

## 【0275】

## 実施例 8

ミクロスワッチアッセイを用いた PspMan4 変異体の洗浄性能

生化学的特徴付け用に PspMan4 変異体酵素サンプルを作製するために、形質転換した枯草菌 (*B. subtilis*) 細胞の選択的増殖を、96 ウェル MTP 中で 37 にて 68 時間、各ウェル内の培地 (主要な窒素源としての尿素、主要な炭素源としてのグルコースを有し、ロバストな細胞増殖のために 1% ソイトンを補った、MOPS バッファ

に基づく半規定富化培地)中で実行した。培養物を、3600rpmにて45分間の遠心分離によって収穫して、Multiscreen(登録商標)フィルタプレート(EMD Millipore, Billerica, MA, USA)により、Millipore真空系を用いて濾過した。濾過した培養液の上澄みを、以下に記載するアッセイに用いた。  
【0276】

PspMan4変異体を、以下の実施例で示すように、ローカストビーンガム(LBG)マイクロスワッチ(CFT C-S-73, Center for Test materials, Vlaardingen, The Netherlands)に対する洗浄性能について、親の性能と比較して試験した。

【0277】

人為的な汚れからのガラクトマンナン除去を測定するために開発された高スループットアッセイを用いて、洗浄性能を測定した。アッセイは、LBGを含有する人為的な汚れからのLBGの放出を測定する。市販の試薬(カタログNo. 23225, Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL)を用いたBCA反応を用いて、酵素の存在下での溶液中のオリゴサッカライドの還元末端を、ブランク対照と比較して測定した。この測定値は、酵素の洗浄性能と相関する。マンナーゼがガラクトマンナンを加水分解するので、還元末端を有する様々な長さのオリゴサッカライドが、おそらく、ワタスワッチから放出される。次に、BCA試薬中のピシンコニン酸により、 $Cu^{2+}$ の還元によって形成される $Cu^{1+}$ の高度に感度の良い比色検出が可能となる。

【0278】

5.5cm直径の2つのLBGマイクロスワッチ(CFT C-S-73)を、平底ノンバインディング96ウェルアッセイプレート(例えばCorning 3641)の各ウェルに入れた。酵素を、50mM MOPSバッファ、pH7.2、0.005%TWEEN(登録商標)-80含有中に希釈した。マイクロスワッチアッセイバッファ(25mM HEPES、pH8、2mM  $CaCl_2$ 、0.005%TWEEN(登録商標)-80)及び希釈酵素のアリコート、96ウェルマイクロスワッチアッセイプレートの各ウェルに、組み合わせて100 $\mu$ L容量になるように加えた。プレートをシールして、(例えば、iEMSインキュベーター/シェーカー、Thermo Fisher Scientific, Waltham, MAにおいて)1150rpmにて20分間攪拌しながら、25にてインキュベートした。インキュベーションの後、放出された還元糖を、実施例2の節「マンナーゼ活性アッセイ」に記載したBCA試薬アッセイを用いて定量化した。生じた吸光度を、洗浄性能の尺度とした。変異体の洗浄性能を、同じタンパク質濃度の親の洗浄性能で割ることによって、洗浄性能PI値を算出した。親酵素の標準曲線について測定した値のLangmuirフィットから抽出したパラメータを用いて、関連タンパク質濃度での親酵素の洗浄性能についての理論値を算出した。表7は、先に記載したマイクロスワッチアッセイにおいて、PspMan4親に対して洗浄性能が向上したPspMan4変異体を示す。

【0279】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表 7: PspMan4 親と比較した、マイクロスイッチアッセイにおけるマンナーゼ変異体の洗浄性能	
マンナーゼ	PspMan4 に対する洗浄性能指数(PI)
PspMan115	1.0
PspMan118	1.0
PspMan120	1.0
PspMan125	1.0
PspMan126	1.1
PspMan127	1.1
PspMan132	1.1
PspMan133	1.2
PspMan134	1.1
PspMan137	1.1
PspMan140	1.0
PspMan141	1.1
PspMan142	1.0
PspMan143	1.3
PspMan144	1.2
PspMan145	1.5
PspMan152	1.0
PspMan155	1.2
PspMan157	1.0
PspMan6428	1.3
PspMan6574	1.1
PspMan6668	1.0
PspMan6670	1.0
PspMan7154	1.0

【 0 2 8 0】

実施例 9

バッファ溶液中での P s p M a n 4 変異体の安定性

高温にて5分間のインキュベーション後にサンプルの残留活性を測定することによって、P s p M a n 4 変異体の安定性を、表 8 に示す温度での、50 mM M O P S バッファ、pH 7.2、0.005% T W E E N (登録商標) - 80 におけるストレス条件下で試験した。バッファ中でのタンパク質安定性アッセイに用いた条件を、表 8 に示す。

【 0 2 8 1】

## 【表 1 4】

表 8: バッファ中でのタンパク質安定性アッセイに用いた条件		
条件	説明	ストレス温度(°C)
A	50 mM MOPS バッファ, pH 7.2, 0.005% TWEEN®-80	60
B	50 mM MOPS バッファ, pH 7.2, 0.005% TWEEN®-80	66
C	50 mM MOPS バッファ, pH 7.2, 0.005% TWEEN®-80	65
H	50 mM MOPS バッファ, pH 7.2, 0.005% TWEEN®-80	59

## 【0 2 8 2】

初期の（ストレスのない）活性を測定するために、実施例 2 の節「マンナーゼ活性アッセイ」に記載したアッセイを用いて、酵素サンプルを、50 mM MOPS バッファ、pH 7.2、0.005% TWEEN（登録商標）-80 中に希釈して、直ちに、LBG に対する活性についてアッセイした。ストレスを受けた活性を測定するために、実施例 2 の節「マンナーゼ活性アッセイ」に記載したように、50 mM MOPS バッファ、pH 7.2、0.005% TWEEN（登録商標）-80 中に希釈した酵素サンプルを、シールした PCR プレート内で、サーモサイクラー（Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA）において高温（表 8 に示す）にて 5 分間インキュベートしてから、活性についてアッセイした。

## 【0 2 8 3】

残留活性の計算

先に記載したように、ストレスを受けた活性の値及びストレスのない活性の値を、LBG 基質の加水分解によって一旦測定して、ストレスを受けた活性の、ストレスのない活性に対する比率をとって、100 を乗じることによって、% 残留活性を算出した。表 9 は、表 8 に記載した条件下での安定性アッセイにおいて、PspMan4 親よりも安定性が向上した PspMan4 変異体を示す。

## 【0 2 8 4】

10

20

30

40

50

【表 15】

表 9: PspMan4 親と比較して、バッファ中の安定性が向上した PspMan4 変異体				
試験したマンナーゼ	%残留活性			
	条件* A	条件* B	条件* C	条件* H
PspMan4	6%	2%	2%	4%
PspMan115	93%	ND	ND	ND
PspMan116	87%	ND	ND	ND
PspMan117	88%	ND	ND	ND
PspMan118	ND	92%	ND	ND
PspMan119	ND	37%	ND	ND
PspMan120	ND	45%	ND	ND
PspMan121	ND	34%	ND	ND
PspMan125	ND	30%	ND	ND
PspMan126	ND	37%	ND	ND
PspMan127	ND	40%	ND	ND
PspMan128	ND	16%	ND	ND
PspMan6153	ND	12%	ND	ND
PspMan6428	ND	6%	ND	ND
PspMan6435	ND	6%	ND	ND
PspMan6574	ND	6%	ND	ND
PspMan6668	ND	9%	ND	ND
PspMan6670	ND	10%	ND	ND
PspMan6722	ND	6%	ND	ND
PspMan7154	ND	26%	ND	ND
PspMan122	ND	ND	59%	ND
PspMan124	ND	ND	95%	ND
PspMan129	ND	ND	71%	ND
PspMan130	ND	ND	97%	ND
PspMan_HM48	ND	ND	ND	96%
PspMan_HM49	ND	ND	ND	88%
PspMan_HM50	ND	ND	ND	62%
PspMan_HM51	ND	ND	ND	53%
PspMan_HM52	ND	ND	ND	32%
PspMan_HM53	ND	ND	ND	28%
PspMan_HM54	ND	ND	ND	41%
PspMan_HM55	ND	ND	ND	49%
PspMan_HM56	ND	ND	ND	79%
PspMan_HM57	ND	ND	ND	88%
PspMan_HM58	ND	ND	ND	89%
PspMan_HM59	ND	ND	ND	78%
PspMan_HM60	ND	ND	ND	65%
PspMan_HM61	ND	ND	ND	76%
PspMan_IIM62	ND	ND	ND	25%
PspMan_IIM63	ND	ND	ND	28%
PspMan_HM64	ND	ND	ND	22%
PspMan_HM66	ND	ND	ND	27%
PspMan_HM67	ND	ND	ND	26%
PspMan_HM71	ND	ND	ND	9%

\* ND:判定せず

## 【0285】

## 実施例 10

## 洗剤溶液中での P s p M a n 4 変異体の安定性

P s p M a n 4 変異体の安定性を、ストレス条件下で、市販の T I D E (登録商標) 液体洗濯洗剤 (Original scent, Procter and Gamble、2014 年に一地方のスーパーマーケットで購入して、実施例 4 に記載したプロトコルを用いて熱不活化した) の 10% (v/v) 水溶液中で、高温 (表 10 に示す) にて 5 分間インキュベーションした後のサンプルの残留活性を測定することによって、試験した。

## 【0286】

## 【表 1 6】

条件	説明	ストレス温度(℃)
D	TIDE <sup>®</sup> 液体洗濯洗剤の 10%溶液	55
E	TIDE <sup>®</sup> 液体洗濯洗剤の 10%溶液	56
F	TIDE <sup>®</sup> 液体洗濯洗剤の 10%溶液	58
G	TIDE <sup>®</sup> 液体洗濯洗剤の 10%溶液	41

10

## 【0 2 8 7】

熱不活化洗剤の 12.5% (v/v) 水溶液を調製して、濾過した培養液の上澄み由来の酵素サンプルを、この洗剤溶液の、10% (v/v) の最終洗剤濃度を達成するのに適切な容量と混合した。初期の(ストレスのない)活性を測定するために、実施例 2 で記載したマンナナーゼ活性アッセイを用いて、この混合物のアリコートを直ちに、50 mM MOPS バッファ、pH 7.2、0.005% TWEEN (登録商標) - 80 中に希釈して、LBG に対する活性についてアッセイした。ストレスを受けた活性を測定するために、実施例 2 のマンナナーゼ活性アッセイに記載したように、洗剤溶液と混合した酵素サンプルを、シールした PCR プレート内で、サーモサイクラー (Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) において高温 (表 10 に示す) にて 5 分間インキュベートしてから、50 mM MOPS バッファ、pH 7.2、0.005% TWEEN (登録商標) - 80 中に希釈して、活性についてアッセイした。

20

## 【0 2 8 8】

## 残留活性の計算

先に記載したように、ストレスを受けた活性の値及びストレスのない活性の値を、LBG 基質の加水分解によって一旦測定して、ストレスを受けた活性の、ストレスのない活性に対する比率をとって、100 を乗じることによって、% 残留活性を算出した。誤差限界は、約 5% 以内であった。表 11 は、表 10 に記載した条件下での安定性アッセイにおいて、PspMan 4 親よりも安定性が向上した PspMan 4 変異体を示す。

30

## 【0 2 8 9】

40

50

【表 17】

マンナナーゼ	%残留活性			
	条件* D	条件* E	条件* F	条件* G
PspMan4	1%	5%	6%	10%
PspMan132	54%	ND	ND	ND
PspMan133	29%	ND	ND	ND
PspMan134	53%	ND	ND	ND
PspMan135	53%	ND	ND	ND
PspMan136	55%	ND	ND	ND
PspMan137	ND	24%	ND	ND
PspMan138	ND	60%	ND	ND
PspMan139	ND	60%	ND	ND
PspMan140	ND	54%	ND	ND
PspMan141	ND	67%	ND	ND
PspMan142	ND	26%	ND	ND
PspMan143	ND	68%	ND	ND
PspMan144	ND	78%	ND	ND
PspMan145	ND	61%	ND	ND
PspMan130	ND	ND	21%	ND
PspMan148	ND	ND	42%	ND
PspMan150	ND	ND	38%	ND
PspMan151	ND	ND	38%	ND
PspMan152	ND	ND	42%	ND
PspMan153	ND	ND	29%	ND
PspMan154	ND	ND	48%	ND
PspMan155	ND	ND	14%	ND
PspMan156	ND	ND	36%	ND
PspMan157	ND	ND	61%	ND
PspMan158	ND	ND	54%	ND
PspMan_HM50	ND	ND	ND	89%
PspMan_HM51	ND	ND	ND	64%
PspMan_HM56	ND	ND	ND	78%
PspMan_HM57	ND	ND	ND	69%
PspMan_HM58	ND	ND	ND	64%
PspMan_HM59	ND	ND	ND	29%
PspMan_HM64	ND	ND	ND	21%
PspMan_HM66	ND	ND	ND	36%
PspMan_HM67	ND	ND	ND	21%
PspMan_HM71	ND	ND	ND	18%

\* ND:判定せず

## 【0290】

## 実施例 11

Terg-o-tometer 中での PspMan118 変異体の洗浄性能

PspMan118 を、MES バッファ pH 5.3 中での硫酸アンモニウム沈殿によって清澄化したバチルス (Bacillus) 属培養液の上澄みから単離した。精製を、疎水性交換クロマトグラフィに続く、50 mM MES バッファ、pH 6.0 中への透析によって達成した。次に、プロピレングリコールを加えて 40% の最終濃度にして、サンプルを、更なる特徴付けまで冷蔵保存した。

## 【0291】



P s p M a n 1 1 8 及び市販のマナーゼ ( M A N N A W A Y ( 登録商標 ) 4 L、N o v o z y m e s A S , D e n m a r k ) の洗い性能を、洗濯洗剤用途において、T e r g - o - t o m e t e r を用いて試験した。性能評価を 1 6 にて行った。汚れ負荷は、1 L の脱イオン水で満たした t e r g - o - t o m e t e r ビーカーにおいて、2 つの C F T C - S - 7 3 L B G のスワッチ ( C e n t e r f o r T e s t m a t e r i a l s B V , V l a a r d i n g e n , N e t h e r l a n d s ) からなった。水硬度を 1 0 0 p p m ( 3 : 1 C a : M g ) に調整した。U l t r a T i d e ( 登録商標 ) C l e a n B r e e z e P o w d e r L a u n d r y D e t e r g e n t ( 2 0 1 4 年に一地方のスーパーマーケットで購入した ) を、ビーカーに 0 . 6 g / L にて加えた。各マナーゼを、ビーカーに種々の用量にて、1 2 分の洗い用に加えた。洗い処理の後、スワッチを遠心乾燥させてから、空気乾燥させた。各スワッチを、色彩計 ( K o n i c a M i n o l t a C h r o m a M e t e r C R - 4 1 0、5 0 m m の口径 ) を用いて、処理の前後に測定した。

10

## 【0292】

L、a、b 値の差異を、C I E - L A B 色空間によって定義される総色差 ( d E ) に変換した。これらの値を用いて、スワッチの洗浄レベルを判定して、結果をパーセント染み除去 ( % S R I ) として表した。P s p M a n 1 1 8 及び M A N N A W A Y ( 登録商標 ) 4 L による C F T C - S - 7 3 スワッチの洗浄結果を、図 4 に示す。この洗浄アッセイにおいて、P s p M a n 1 1 8 及び M A N N A W A Y ( 登録商標 ) 4 L は、粉末洗濯洗剤中で、L B G の汚れに対して、匹敵する染み除去を示した。

20

## 【0293】

## 実施例 1 2

## P s p M a n 4 変異体の結晶構造

P s p M a n 4 変異体、P s p M a n 1 1 8 及び P s p M a n 1 4 8 の三次元構造を、X 線結晶学的方法を用いて判定した。

## 【0294】

突然変異 P 1 9 E / T 3 8 E / N 6 7 D / N 9 7 D / Y 1 2 9 M / P 1 6 8 S / Q 1 8 4 L / K 2 4 4 L / S 2 5 8 D / N 2 6 1 R を有する P s p M a n 1 1 8 ( 配列番号 4 9 ) ( アミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けている ) を、ハンギングドロップ法を用いて、5 0 m M 塩化ナトリウムを有する 5 0 m M M E S バッファ、p H 6 . 0 中 1 % タンパク質溶液で始めて結晶化させた。リザーバー溶液は、0 . 7 M リン酸ナトリウム、0 . 8 M リン酸カリウム、及び 0 . 1 M H E P E S p H 7 . 5 を含有した。結晶は、一分子が単位格子定数 ( u n i t c e l l d i m e n s i o n s ) a = 5 3 . 2 、 b = 7 6 . 7 、及び c = 7 7 . 3 の非対称単位である空間群 P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> に成長した。

30

## 【0295】

突然変異 N 1 0 T / P 1 9 E / S 3 0 T / T 3 8 E / S 5 9 V / L 6 0 Q / K 6 3 R / N 6 7 D / N 9 7 D / Y 1 2 9 M / K 1 4 3 Q / P 1 6 8 S / Q 1 8 4 L / G 2 2 5 P / T 2 2 8 V / Y 2 3 5 L / K 2 4 4 L / S 2 5 8 D / N 2 6 1 R / Z 2 9 8 . 0 1 Q を有する P s p M a n 1 4 8 ( 配列番号 7 4 ) ( アミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けている ) を、ハンギングドロップ法を用いて、5 0 m M 塩化ナトリウムを有する 5 0 m M M E S バッファ、p H 6 . 0 中 1 % タンパク質溶液で始めて結晶化させた。リザーバー溶液は、1 6 % 2 - プロパノール、0 . 1 6 M 塩化カルシウム、及び 8 0 m M 酢酸ナトリウム、p H 4 . 6 を含有した。結晶は、一分子が単位格子定数 a = 5 2 . 8 、 b = 7 7 . 0 、及び c = 7 8 . 5 の非対称単位である空間群 P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> に成長した。

40

## 【0296】

P s p M a n 1 1 8 結晶及び P s p M a n 1 4 8 結晶についてのデータを、B r u k e r X 8 P r o t e u m 回折系で、それぞれ 1 . 8 及び 1 . 7 の分解能で収集した。データ収集についての付加的な統計を、表 1 2 に示す。

50

## 【0297】

PspMan118の構造を、出発モデルとしてのバチルス(Bacillus)属種JAMB-602マンナーゼ(受託番号BAD99527.1、PDBエントリ1WKY\_A)由来の残基27~326の座標との分子置換を用いて判定した。モデルを、Cootソフトウェアパッケージを用いてフィットさせた[Emsley, P. et al (2010), Acta Cryst. D; 66: 486-501]。

## 【0298】

PspMan148の構造を、出発モデルとしてのPspMan118の座標との分子置換を用いて判定した。付加的な置換について電子密度を合わせるように座標を調整して、Cootソフトウェアパッケージを用いてフィットさせた。PspMan148のC末端に挿入された付加的な残基、Z298.01Qについて、疎らな弱い密度が観察された。フィッティング調整及びリフィッティング調整の後に、双方の構造についての座標を、CCP4ソフトウェアスイートにおいて標準的なデフォルト設定のREFMACプログラムを用いてリファインした。

## 【0299】

表13に報告するように、最終モデルは立体化学が良好であった。参照のため、PspMan118変異体及びPspMan148変異体の座標をアラインすることができ、1954個の共通原子について、全体のrms(二乗平均平方根)偏差が0.133であった。

## 【0300】

## 【表18】

	PspMan118	PspMan148
波長	1.54Å	1.54Å
空間群	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
分子/非対称単位	1	1
単位格子定数	53.2, 76.7, 77.3 Å	52.8, 77.0, 78.5 Å
分解能	1.8Å	1.7Å
特有の反射	27826	32080
多重度	5.8 (1.8)	2.5 (1.4)
完全性	98.8%	97.9%
R merge	0.04(0.14)*	0.05 (0.10)
I/σ	25.4 (4.7)	14.4 (4.8)

\*外殻についての値を括弧内に示す

## 【0301】

## 【表19】

	PspMan118	PspMan148
R work	0.16	0.15
R free	0.20	0.18
タンパク質残基数	297	298
原子数	2277	2288
rmsd 結合長さ	0.0196Å	0.0138Å
rmsd 結合角度	1.86°	1.55°

## 【0302】

PspMan118モノマーの座標を、2つの他のマンナーゼ構造:バチルス(Ba

c i l l u s ) 属種株 J A M B - 6 0 2 マンナーゼ ( P D B エントリ 1 W K Y \_ A ) 及び B . アガラドハエレンス ( B . a g a r a d h a e r e n s ) 株 N C I M B 4 0 4 8 2 マンナーゼ ( P D B エントリ 2 W H L \_ A ) の触媒ドメインと重ねると、全ての共通原子を用いて、全体の r m s 偏差がそれぞれ 0 . 3 8 及び 0 . 4 2 である。ゆえに、これらの3つの酵素が、P s p M a n 4 の残基 1 ~ 2 9 5 に対して約 6 0 % のみのアミノ酸配列同一性を共有するにしても、3つのマンナーゼは全て、触媒ドメインについて共通の折畳みを共有する。

#### 【 0 3 0 3 】

図 5 は、1 W K Y \_ A マンナーゼの、P s p M a n 1 1 8 変異体との構造比較を表しており、1 W K Y \_ A の主鎖折畳み ( 灰色で示す ) を、P s p M a n 1 1 8 の主鎖折畳み ( 黒色で示す ) と比較している。図 5 は、P s p M a n 1 1 8 が、1 W K Y \_ A と共通の陽イオン結合部位を共有することを、そして 1 W K Y \_ A が、付加的な炭水化物結合ドメインを有することを示す。P s p M a n 1 1 8 が 1 W K Y \_ A と共有する陽イオン結合部位は、G l y 2 2 5 残基のカルボニル酸素、A s p 2 3 1 の側鎖、T h r 2 3 2 のカルボニル酸素、及び G l u 2 3 4 の側鎖によって形成される。

#### 【 0 3 0 4 】

P s p M a n 1 1 8 及び P s p M a n 1 4 8 は、他の G H 5 マンナーゼ配列、例えば 1 W K Y \_ A 及び 2 W H L \_ A によって例示されるものに対して、2つのモチーフ：( i ) 位置 N 3 4 D 3 5 L 3 6 の N D L モチーフ、及び ( i i ) 位置 2 6 3 ~ 2 7 4 にまたがる欠失モチーフ ( アミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けている ) によってさらに特徴付けられ得る。図 6 は、P s p M a n 1 1 8 の、1 W K Y \_ A との更なる構造比較を表しており、この比較は、P s p M a n 1 1 8 の N D L モチーフ及び欠失モチーフを包含する残基が、互いに近接であることを示す。

#### 【 0 3 0 5 】

B . アガラドハエレンス ( B . a g a r a d h a e r e n s ) 2 W H L \_ A マンナーゼ構造は、マンノトリオシル - 酵素複合体として報告されてきた。P s p M a n 1 4 8 の構造を、2 W H L \_ A とアラインして、活性部位において結合するマンノトリオースに対する変異部位の位置を研究した。P s p M a n 1 4 8 を比較のために選択した。というのもこれは、P s p M a n 1 1 8 に存在する 1 0 個の置換を全て、そして C 末端の 9 個の付加的置換及び 1 個の挿入を含むからである。P s p M a n 1 1 8 と同様に、P s p M a n 1 4 8 の構造を 2 W H L \_ A の構造とアラインすることができ、結果として、1 6 6 0 個の共通原子について、0 . 4 0 5 の全体的な r m s 偏差が生じる。P s p M a n 1 4 8 構造及び 2 W H L \_ A 構造の重ね合せを、図 7 A ~ 図 7 C に表す。

#### 【 0 3 0 6 】

図 7 A において、2 W H L \_ A の主鎖折畳みを淡い灰色で概略的に示し、そしてマンノトリオースを淡い灰色のスティックとして示す。P s p M a n 1 4 8 の主鎖を黒色で示し、1 9 個の置換アミノ酸の側鎖を黒色のスティック図として示す。P s p M a n 1 4 8 内に挿入されたアミノ酸 Z 2 9 8 . 0 1 Q は、電子密度地図において乱れ ( d i s o r d e r e d ) 、この図に含まれていない。

#### 【 0 3 0 7 】

P s p M a n 1 4 8 における 1 9 個の置換のうち 7 個が、基質結合部位に位置する。これらは、S 3 0 T 、S 5 9 V 、L 6 0 Q 、K 6 3 R 、T 2 2 8 V 、S 2 5 8 D 、及び N 2 6 1 R を含む ( アミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けている ) 。図 7 B は、P s p M a n 1 4 8 構造及び 2 W H L \_ A 構造の重ね合せを示し、基質結合部位の置換を黒色の球として示す。これらの置換のうち、L 6 0 Q は、1 W K Y \_ A 構造及び 2 W H L \_ A 構造の双方における相同位置にて見られ得る側鎖を導入している。P s p M a n 1 4 8 の活性部位中に見出される 2 つの他の残基：T r p 6 1 及び T r p 2 6 0 は、1 W K Y \_ A 及び 2 W H L \_ A の双方に共通である ( アミノ酸位置は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列との対応によって番号を付けている ) 。これらのマンナーゼ間の強い構造的類似性を考慮すると、1 W K Y \_ A マンナーゼ又は 2 W H L \_ A マンナ

10

20

30

40

50

ナーゼのいずれかの構造的相同部位にて P s p M a n 4 の向上を付与する置換を導入することで、これらの分子に、性能及び/又は安定性の類似した向上が付与され得ると予想することができる。

【0308】

図7Bにおいて、2WHL\_\_Aマンナーゼに結合したマンノトリオシル部分を、灰色のスティックとして示して、基質結合部位の相対的位置を示す。基質結合部位の周りの、且つ近くの、P s p M a n 1 4 8 における7個の置換(S 3 0 T、S 5 9 V、L 6 0 Q、K 6 3 R、T 2 2 8 V、S 2 5 8 D、及びN 2 6 1 R)の位置を、黒色の球として示す。

【0309】

図7Cに見られるように、P s p M a n 1 4 8 中の残りの12個の置換は、分子の表面上に分配されている(黒色の球として示す)。これらの12個の置換のうち、Q 1 8 4 L 及び G 2 2 5 P に特に注目する。Q 1 8 4 L 置換は、A r g 1 4 9 と G l u 1 8 2 との間の塩架橋を保護するロイシン側鎖を導入することによって、タンパク質を安定化させる。G 2 2 5 P 置換は、剛性付与(r i g i d i f y i n g)プロリン残基を導入し、そこで主鎖カルボニル酸素は、陽イオン(P s p M a n 1 4 8 中のカルシウムイオン)に対するリガンドを形成することによって、結合したカルシウムを潜在的に安定化させて、これにより酵素は、洗剤製剤中に存在するキレート剤に対する感度がより低くなる。

【0310】

実施例13

P s p M a n 4 変異体の、年数を経た洗浄性能

P s p M a n 4 変異体を、100%洗剤中での室温でのインキュベーションの前後の洗浄性能について試験した。インキュベーション後の残りの%洗浄活性を、インキュベーション前の初期の洗浄活性と比較した。

【0311】

インキュベーションに用いる市販の液体洗濯洗剤を、一地方のスーパーマーケットで購入して(洗剤名: T o t a l C o l o r ; メーカー: 自家ブランド; 購入国: スイス; 購入年: 2011年)、先の実施例4に記載したプロトコルを用いて熱不活化した。

【0312】

1枚のミニ攪拌ディスク(T u m b l e S t i r D i s k , カタログNo. P 7 2 1 F - 1 , V & P S c i e n t i f i c , S a n D i e g o , C A ) を、U底のローバインディングポリプロピレン96ウェルMTPの各ウェルに入れてから、100% T o t a l C o l o r 液体洗剤を加えた。濾過した培養液の上澄み由来の酵素サンプルを、この洗剤で満たしたMTPに加えて(サンプルの、洗剤に対する比率はおおよそ1:11(v/v))、磁気タンピング混合装置(V P 7 1 0 シリーズ、V & P S c i e n t i f i c , S a n D i e g o , C A ) を用いて5分間混合した。酵素-洗剤インキュベーションプレートの各ウェルからアリコートを探って、先の実施例8に記載したマイクロスワッチ洗浄性能アッセイを実行することによって、初期の洗浄性能(時点T=0)を測定した。マイクロスワッチアッセイプレートにおけるサンプルの、バッファに対する比率は、1:9(v/v)であった。

【0313】

次に、洗剤-酵素プレートを、表14A及び表14Bの見出しに示す時間(それぞれ7時間及び9時間)、室温にてインキュベートして、インキュベーション期間の終わりに酵素-洗剤インキュベーションプレートの各ウェルからアリコートを探って、先の実施例8に記載したマイクロスワッチ洗浄性能アッセイを実行することによって、インキュベーション後に残留する洗浄活性を判定した。マイクロスワッチアッセイプレートにおけるサンプルの、バッファに対する比率は、1:9(v/v)であった。残留洗浄値(%残留洗浄活性)を、インキュベーション後の洗浄活性(マイクロスワッチ洗浄アッセイにおいて測定した)の、時間T=0にて測定した初期の洗浄活性に対する比率をとって、100を乗じることによって得た。

【0314】

表 1 4 A 及び表 1 4 B は、年数を経た洗浄性能アッセイ（示したインキュベーション期間後に残留する % 洗浄活性として示す）における P s p M a n 4 変異体の性能を、P s p M a n 4 親と比較して一覧にしている。

【 0 3 1 5 】

【表 2 0】

表 14A: PspMan4 親と比較した、 % 残留洗浄活性として報告する、 PspMan4 変異体の年数を経た洗浄性能	
試験したマンナナーゼ	7 時間後の % 残留洗浄活性
PspMan4	0%
PspMan115	73%
PspMan116	65%
PspMan117	54%
PspMan118	93%
PspMan119	99%
PspMan120	71%
PspMan121	68%
PspMan122	73%
PspMan124	91%
PspMan125	77%
PspMan126	77%
PspMan127	64%
PspMan128	38%
PspMan129	16%
PspMan130	16%
PspMan132	30%
PspMan133	75%
PspMan134	75%
PspMan135	48%
PspMan136	33%
PspMan137	44%
PspMan138	38%
PspMan139	99%
PspMan140	51%
PspMan141	106%
PspMan142	41%
PspMan143	84%
PspMan144	32%
PspMan145	15%
PspMan148	74%
PspMan150	71%

表 14A: PspMan4 親と比較した、 % 残留洗浄活性として報告する、 PspMan4 変異体の年数を経た洗浄性能	
試験したマンナナーゼ	7 時間後の % 残留洗浄活性
PspMan151	53%
PspMan152	84%
PspMan153	50%
PspMan154	71%
PspMan155	76%
PspMan156	59%
PspMan157	64%
PspMan158	75%
PspMan6153	58%
PspMan6428	92%
PspMan6435	88%
PspMan6574	79%
PspMan6668	70%
PspMan6670	78%
PspMan6722	45%
PspMan7154	75%

10

20

30

40

【 0 3 1 6 】

50

【表 2 1】

表 14B: PspMan4 親と比較した、 %残留洗浄活性として報告する、 PspMan4 変異体の年数を経た洗浄性能	
試験したマンナナーゼ	9 時間後の %残留洗浄活性
PspMan4	0%
PspMan_HM48	84%
PspMan_HM49	35%
PspMan_HM50	79%
PspMan_HM51	45%
PspMan_HM52	11%
PspMan_HM54	14%
PspMan_HM56	98%
PspMan_HM57	80%
PspMan_HM58	73%
PspMan_HM59	98%
PspMan_HM60	12%
PspMan_HM64	21%
PspMan_HM66	64%
PspMan_HM67	61%
PspMan_HM71	13%

10

20

30

40

50

【図面】  
【図 1】

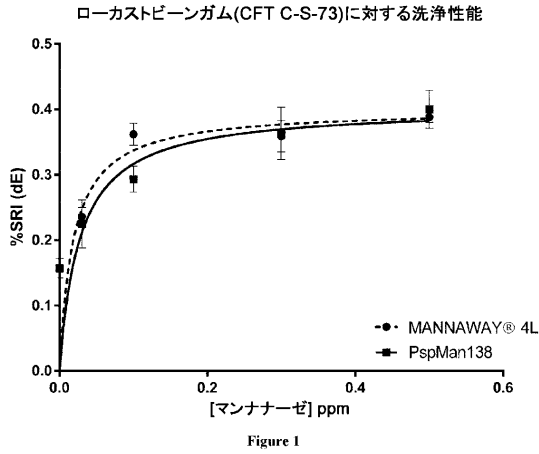


Figure 1

【図 2 A】

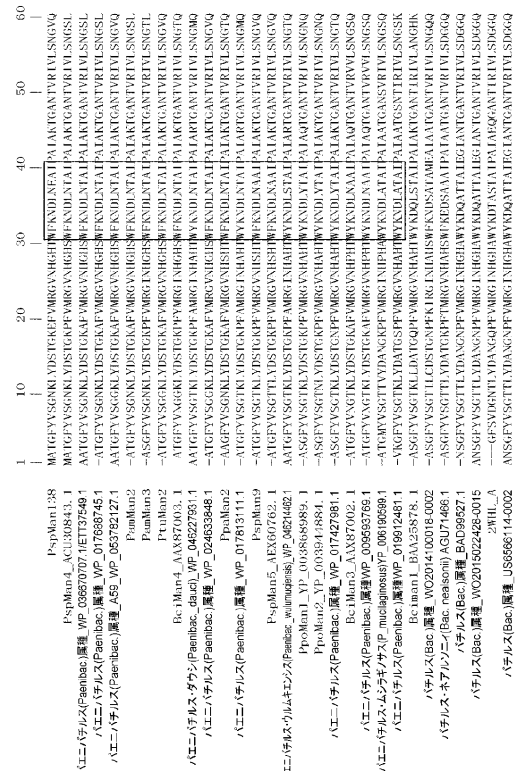


Figure 2A

【図 2 B】



Figure 2B

【図 2 C】

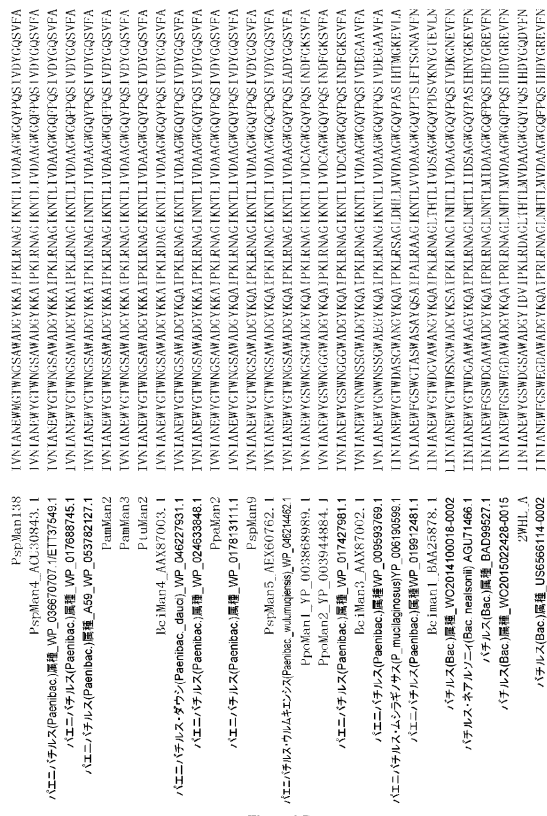


Figure 2C

10

20

30

40

50

【 図 2 D 】



Figure 2D

【 図 2 E 】

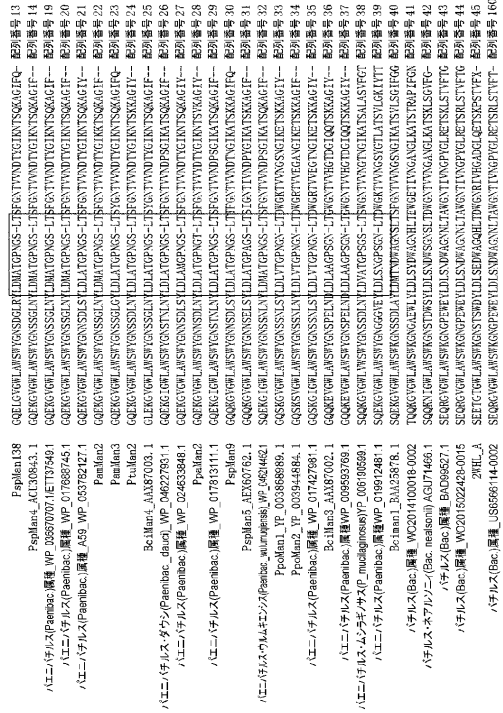


Figure 2E

【 図 3 】

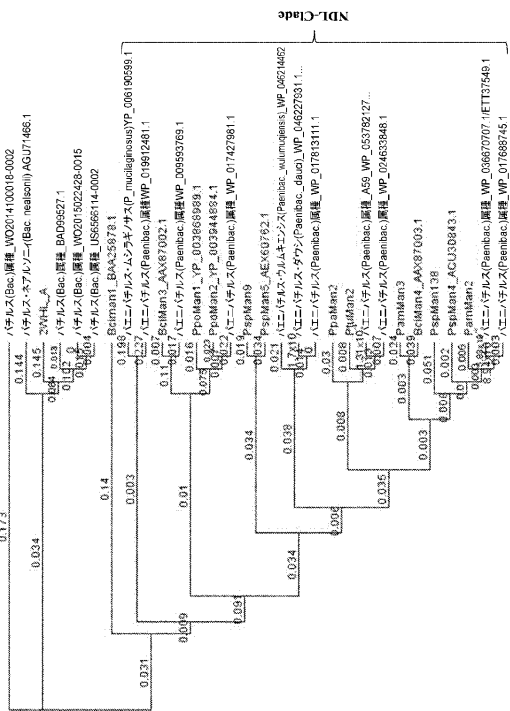


Figure 3

【 図 4 】

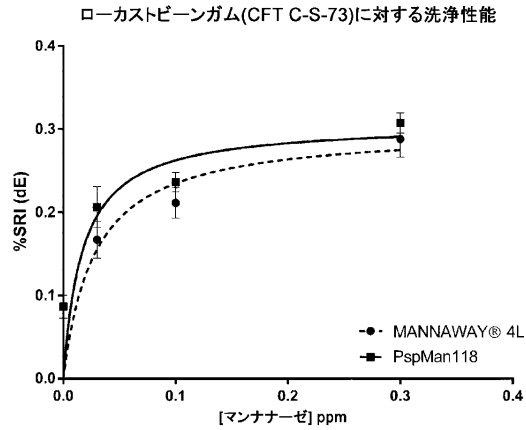


Figure 4

Figure 2E



【 図 5 】

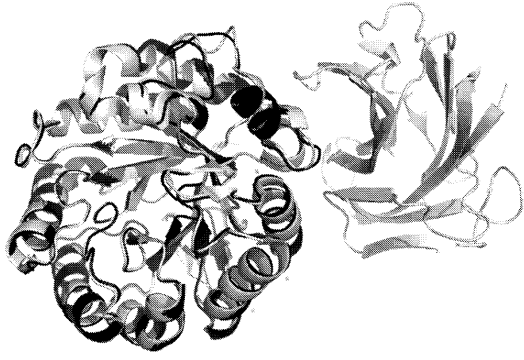


Figure 5

【 図 6 】

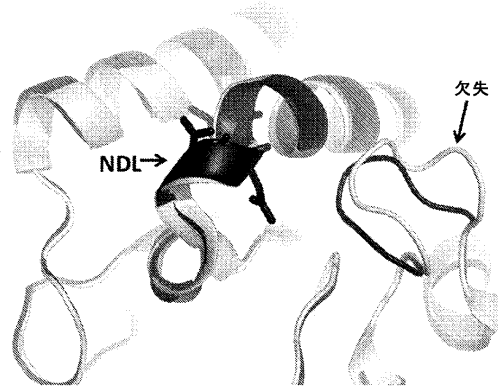


Figure 6

10

【 図 7 A 】



Figure 7A

【 図 7 B 】



Figure 7B

20

30

40

50


【 7 C】



Figure 7C

【配列表】

[0007364331000001.app](#)

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

		F I		
A 2 3 L	33/195 (2016.01)	A 2 3 L	33/195	
C 1 1 D	7/42 (2006.01)	C 1 1 D	7/42	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	9/24 (2006.01)	C 1 2 N	9/24	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
D 0 6 L	4/40 (2017.01)	D 0 6 L	4/40	

(31)優先権主張番号 62/278,387

(32)優先日 平成28年1月13日(2016.1.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 アダムス、クリスチャン・ディー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(72)発明者 アレクセーエフ、ビクター・ユリエヴィッチ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(72)発明者 ボット、リチャード

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(72)発明者 マルケズ、デイヴィッド

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(72)発明者 スコッチャー、マイルス・クリストファー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(72)発明者 ヤオ、ジアン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

合議体

審判長 福井 悟

審判官 上條 肇

審判官 牧野 晃久

(56)参考文献 Mannase [ *Bacillus circulans* ], Genbank [ online ], 2009.11.03, [ retrieved on 2020.10.29 ], retrieved from the Internet, Accession AAX87003

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C12N 9/00 - 9/99

C12N 1/00 - 7/08

C12N 15/00 - 15/90

C12P 1/00 - 41/00

A23L 1/04 - 1/09

A23L 1/27 - 1/308

UniProt / GENESEQ

Pubmed